

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN-TARAPOTO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE AGROSILVO PASTORIL
ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA



TESIS

**“IDENTIFICACIÓN DE HONGOS ENDÓFITOS Y SU USO EN LA
BIOPROTECCION DE PLÁNTULAS DE CAFÉ PARA REDUCIR EL
DAÑO DE *Colletotrichum coffeanum* EN SAN MARTIN - PERÚ”**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
INGENIERO AGRÓNOMO**

**PRESENTADO POR EL BACHILLER:
FRANK SHAMIR CARBAJAL ALARCON**

**TARAPOTO – PERÚ
2017**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN-TARAPOTO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE AGROSILVO PASTORIL
ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA
ÁREA DE MEJORAMIENTO Y PROTECCIÓN DE CULTIVOS**

TESIS

**“IDENTIFICACIÓN DE HONGOS ENDÓFITOS Y SU USO EN LA
BIOPROTECCION DE PLÁNTULAS DE CAFÉ PARA REDUCIR EL
DAÑO DE *Colletotrichum coffeanum* EN SAN MARTIN - PERÚ”**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
INGENIERO AGRÓNOMO**

**PRESENTADO POR EL BACHILLER:
FRANK SHAMIR CARBAJAL ALARCON**

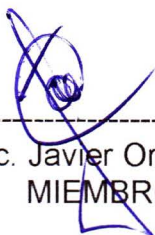
COMITÉ DE TESIS



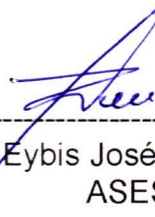
Dr. Winston Franz Ríos Ruiz
PRESIDENTE



Ing. M.Sc. Armando D. Cueva Benavides
SECRETARIO



Ing. MSc. Javier Ormeño Luna
MIEMBRO



Ing. Eybis José Flores García
ASESOR

**TARAPOTO – PERÚ
2017**

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN

SUMMARY

| | Pág. |
|---|-----------|
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| II. OBJETIVOS | 2 |
| III. REVISIÓN DE LITERATURA | 3 |
| 3.1. Generalidades del cultivo de café | 3 |
| 3.2. Enfermedades del cultivo de café | 3 |
| 3.3. Origen y evolución de los hongos endófitos | 5 |
| 3.4. Ecología de los hongos endófitos | 8 |
| 3.5. Consideraciones generales sobre los hongos | 8 |
| 3.6. Naturaleza de la interacción planta - hongo endófito | 9 |
| 3.7. Microorganismos endófitos en plantas de café | 10 |
| 3.8. Investigaciones con hongos endófitos | 12 |
| IV. MATERIALES Y METODOLOGÍA | 15 |
| 4.1. Materiales | 15 |
| 4.2. Metodología para identificar la diversidad micobiótica endófitas en café procedente del sector San Roque de Cumbaza. | 15 |
| 4.2.1. Método de muestreo en campo | 15 |
| 4.2.2. Aislamiento de hongos endófitos | 16 |
| 4.2.3. Selección y colección de la muestra para encontrar <i>Colletotrichum</i> sp | 16 |
| 4.2.4. Preparación del medio de cultivo de Papa Sacarosa Agar | 17 |
| 4.2.5. Preparación del medio de cultivo de café. | 18 |
| 4.2.6. Metodología para sembrar los tejidos de café. | 19 |
| 4.2.7. Aislamiento, repique y conservación de hongos endófitos | 20 |
| 4.2.8. Identificación de hongos endófitos | 21 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 4.3. | Determinar la capacidad de antibiosis e hiperparasitismo de cepas de hongos endófitos de café (<i>Coffea arabica</i> L.) contra <i>Colletotrichum</i> sp | 22 |
| 4.4. | Diseño experimental | 23 |
| 4.5. | Variables evaluadas | 24 |
| 4.5.1. | Hiperparasitismo. | 24 |
| 4.5.2. | Antibiosis. | 24 |
| 4.5.3. | Medición lineal de colonias. | 25 |
| 4.6. | Determinar la capacidad endófitica de los hongos aislados en Plántulas de café | 25 |
| 4.6.1. | Preparación de plantas aislar. | 25 |
| 4.6.2. | Colonización de hongos endófitos a plántulas de café | 26 |
| 4.6.3. | Evaluación de área foliar. | 28 |
| 4.6.4. | Número de hojas | 28 |
| V. | RESULTADOS Y DISCUSIONES | 29 |
| 5.1. | Resultados | 29 |
| 5.1.1. | Identificar la diversidad micobiótica endófitica en café | |
| | Procedente del sector San Roque de Cumbaza. | 29 |
| 5.1.1.1. | <i>Trichoderma</i> sp | 29 |
| 5.1.1.2. | <i>Aspergillus</i> sp. | 29 |
| 5.1.1.3. | <i>Verticillium</i> sp | 30 |
| 5.1.1.4. | <i>Thielaviopsis</i> sp | 30 |
| 5.1.1.5. | <i>Scytalidium</i> sp. | 30 |
| 5.1.1.6. | <i>Xylaria</i> sp. | 31 |
| 5.1.1.7. | <i>Nigrospora</i> sp | 31 |
| 5.1.1.8. | <i>Pestalotiopsis</i> sp. | 31 |
| 5.1.2. | Determinar la capacidad de antibiosis e hiperparasitismo de cepas de hongos endófitos contra <i>Colletotrichum</i> sp con la prueba dual | 32 |
| 5.1.3. | Determinar la capacidad endofítica de los hongos aislados en plántulas de café. | 36 |

| | | |
|--------------|--|-----------|
| 5.2. | Discusión | 43 |
| 5.3. | Capacidad de antibiosis e hiperparasitismo de cepas de hongos endófitos de café contra <i>Colletotrichum coffeanum</i> | 47 |
| 5.4. | Capacidad endofítica de los hongos aislados en plántulas de café | 54 |
| VI. | CONCLUSIONES. | 56 |
| VII. | RECOMENDACIONES. | 57 |
| VIII. | BIBLIOGRAFIA | 58 |
| | ANEXOS | |

ÍNDICE DE CUADROS

| Contenido | Pág. |
|--|------|
| 1 Distribución Componentes del estudio | 23 |
| 2 Análisis de varianza para el Área foliar (cm ²) | 41 |
| 3 Prueba de Rangos Múltiples de Duncan (P<0,05) para promedios de área foliar (cm ²) por Tratamiento | 41 |
| 4 Análisis de varianza para el Número de hojas (transformado \sqrt{x}) | 42 |
| 5 Prueba de Rangos Múltiples de Duncan (P<0,05) para promedios del número de hojas por tratamiento | 42 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| Contenido | Pág. |
|--|------|
| 1 Laboratorio de Sanidad Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Ciudad Universitaria de la Universidad Nacional de San Martín (UNSM – Tarapoto) | 15 |
| 2 Colección de muestras de la parte del tercio superior de la planta en el distrito de San Roque de Cumbaza | 17 |
| 3 Preparación de medio de cultivo Papa Sacarosa Agar | 18 |
| 4 Preparación APDC | 19 |
| 5 Cortado y siembra de las muestras de café | 20 |
| 6 Aislamiento, conservación y repique de hongos | 21 |
| 7 Identificación de hongos endófitos | 22 |
| 8 Hiperparasitismo | 24 |
| 9 Medición lineal de colonias a través de una regla horizontal | 25 |
| 10 Cortado de hojas | 26 |
| 11 Colonización de hongos endófitos a plántulas de café | 27 |
| 12 Características de <i>Trichoderma</i> sp | 29 |
| 13 Características de <i>Aspergillus</i> sp | 29 |
| 14 Características de <i>Verticilium</i> sp | 30 |
| 15 Características de <i>Thielaviopsis</i> sp | 30 |
| 16 Características de <i>Scytalidium</i> sp | 30 |
| 17 Características de <i>Xylaria</i> sp | 31 |
| 18 Características de <i>Nigrospora</i> sp | 31 |
| 19 Características de <i>Pestalotiopsis</i> sp | 31 |
| 20 Colonización de hongos endófitos en la prueba dual | 32 |
| 21 Crecimiento lineal de la colonia en cm, para <i>Trichoderma</i> sp - <i>Colletotrichum coffeanum</i> | 32 |

| | | |
|-----------|--|----|
| 22 | Crecimiento lineal de la colonia en cm, para <i>Aspergillus</i> - <i>Colletotrichum coffeanum</i> | 33 |
| 23 | Crecimiento lineal de la colonia en cm, para <i>Verticilium</i> sp - <i>Colletotrichum coffeanum</i> | 33 |
| 24 | Crecimiento lineal de la colonia en cm, para <i>Thielaviopsis</i> sp - <i>Colletotrichum coffeanum</i> | 33 |
| 25 | Crecimiento lineal de la colonia en cm, para <i>Scytalidium</i> sp - <i>Colletotrichum coffeanum</i> | 34 |
| 26 | Crecimiento lineal de la colonia en cm, para <i>Xylaria</i> sp - <i>Colletotrichum coffeanum</i> | 34 |
| 27 | Crecimiento lineal de la colonia en cm, para <i>Nigrospora</i> sp - <i>Colletotrichum coffeanum</i> | 34 |
| 28 | Crecimiento lineal de la colonia en cm, para <i>Pestalotiopsis</i> sp - <i>Colletotrichum coffeanum</i> | 35 |
| 29 | Curvas máximas de crecimiento lineal del hongo <i>Colletotrichum</i> sp y endófitos en cm | 35 |
| 30 | Curvas máximas de crecimiento lineal de hongos endófitos en cm | 35 |
| 31 | capacidad endofítica de <i>Trichoderma</i> sp | 36 |
| 32 | capacidad endofítica de <i>Aspergillus</i> sp | 36 |
| 33 | capacidad endofítica de <i>Verticilium</i> sp | 37 |
| 34 | capacidad endofítica de <i>Thielaviopsis</i> sp | 38 |
| 35 | capacidad endofítica de <i>Scytalidium</i> sp | 38 |
| 36 | capacidad endofítica de <i>Xylaria</i> sp | 39 |
| 37 | capacidad endofítica de <i>Nigrospora</i> sp | 40 |
| 38 | capacidad endofítica de <i>Pestalotiopsis</i> sp | 40 |

RESUMEN

El café en el Perú, es el único producto agrícola de exportación tradicional, se exporta a diferentes países del mundo, en los últimos años la producción se ha visto afectada, por la roya amarilla, el ojo de pollo, araño del cafeto, así como estas existen otras enfermedades como la antracnosis que últimamente están teniendo importancia. El uso de hongos endófitos (*Trichoderma* sp *Aspergillus* sp, *Verticillium* sp) es una alternativa para dar solución a estos problemas, con el objetivo de determinar la influencia de los mejores aislamientos bioprotectores frente a *Colletotrichum coffeanum*. Se lograron identificar ocho hongos endófitos: *Trichoderma* sp, *Aspergillus* sp, *Verticillium* sp, *Thielaviopsis* sp, *Scybalidium* sp, *Xylaria* sp, *Nigrospora* sp y *Pestalotiopsis* sp. En la prueba dual, el hongo endófito *Aspergillus* sp, tuvo el más rápido crecimiento, con 7,28 cm a los cuatro días, y desarrollo lineal de la colonia con 9 cm a los seis días, seguido por *Trichoderma* sp, con 7,14 cm al quinto día en la prueba dual, y 9 cm al 9^{no} día en el desarrollo lineal. En la capacidad endofítica, las plantas inoculadas con *Trichoderma* sp, *Aspergillus* sp y *Verticillium* sp tuvieron mejor efecto obteniendo mayor número de hojas por planta, el tamaño de las plantas, vigor de las hojas además no presentaron síntomas de enfermedad, en cambio las plantas inoculadas con *Thielaviopsis* sp, *Scybalidium* sp, *Xylaria* sp, *Nigrospora* sp, *Pestalotiopsis* sp presentaron hojas pequeñas con clorosis, con síntomas de estrés y enfermedad.

Palabras claves: Antibiosis, hiperparasitismo, hongo endófito, bioprotección

SUMMARY

Coffee being grown in tropical climates, with a relatively high humidity is prone to many diseases of fungal type, and production is greatly affected by them, was affected in the last times. The use of endophytic fungi (*Trichoderma* sp, *Asperillus* sp, *Verticillium* sp) could be an alternative to solve these problems, with the objective of determining the influence of the best bioprotective isolates against *Colletotrichum coffeanum*. it was possible to identify eight endophyte fungi: *Thichoderma* sp, *Aspergillus* sp, *Verticillium* sp, *Thielaviopsis* sp, *Scytalidium* sp, *Xylaria* sp, *Nigrospora* sp and *Pestalotiopsis* sp in the dual test, the endophyte fungus *Aspergillus* sp, had the fastest growth and development linear of the colony, being that at 6 days (6th evaluation) reached its maximum development with 9 cm and at 4 days with a growth of 7.28 cm could control the growth and linear development of *Colletotrichum* sp colony that reached 1.66 cm. followed *Trichoderma* sp, reaching its maximum growth from 9 cm to 9th day (9th evaluation) and that with growth of 7,14 cm to the 5th day (5th evaluation) was able to control the growth and linear development of *Colletotrichum* sp colony that only reached 1, 82 cm. in the endophytic capacity, the plants inoculated with *Trichoderma* sp, *Aspegillus* sp and *Verticillium* sp had better effect obtaining greater number of leaves per plant, the size of the plants, Vigor of the leaves in addition did not present symptoms of disease, in contrast the plants inoculated with *Thielaviopsis* sp, *Scytalidium* sp, *Xylaria* sp, *Nigrospora* sp, *Pestalotiopsis* sp presented small leaves with chlorosis, with symptoms of stress and disease.

Key words: Antibiosis, hyperparasitism, endophyte fungus, bioprotection

I. INTRODUCCIÓN

El café en el Perú, es el único producto agrícola de exportación tradicional, que se exporta a diferentes países del mundo entre ellos Estados Unidos, países de la Unión Europea, China, Japón y Canadá, que se rige por las normas del Codex Alimentarius de la FAO, el Acuerdo del ingreso de Alimentos a la Unión Europea y los requisitos de cada país importador (SUNAT, 2016; OMS, 2016 y FAO 2016).

El café se ve afectado por diversas enfermedades fúngicas, las cuales causan mayores daños en la producción, la roya, ojo de pollo y araño, sin embargo, existen otras enfermedades como antracnosis que en estos últimos años viene causando daños de gran importancia, afectando los rendimientos de producción en los países como Brasil y Colombia, por esto, es de importante conocer el manejo de control para asegurar el óptimo desarrollo y producción del café, (Silva *et al.* 2006).

Existen hongos endófitos que residen en los tejidos de las plantas, principalmente en espacios intercelulares, sin causar síntomas de enfermedad, tienden a competir con el agente causal de antracnosis *Colletotrichum* sp (Bacón *et al.*, 2000).

En el presente trabajo de investigación se logró aislar hongos endófitos de ramas, tallos y flores, luego se describieron las características morfológicas y biométricas de las estructuras vegetativas, propagativas y de conservación. Con ayuda de claves taxonómicas, se identificó el género de cada hongo y se evaluó antibiosis e hiperparasitismo con la que se determinó la capacidad de cada endófito.

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

2.1.1. Evaluar el efecto de bioprotección de hongos endófitos frente a antracnosis (*Colletotrichum coffeanum*) en plántulas de *Coffea arábica* procedentes del distrito de San Roque, provincia de Lamas, departamento de San Martín.

2.2. Objetivos Específicos

2.2.1. Identificar la diversidad micobiótica endófito en café procedente del sector San Roque de Cumbaza.

2.2.2. Evaluar la capacidad de antibiosis e hiperparasitismo de cepas de hongos endófitos de café frente a *Colletotrichum coffeanum*.

2.2.3. Determinar la capacidad endofítica de hongos endófitos colectados de hojas aisladas en plántulas de café.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1. Generalidades del cultivo de café

El café se define como la semilla seca de la planta del café, cuyo origen es de África, su nombre se deriva de la ciudad de Kaffa, en Etiopía, la propagación a nivel mundial del género de la planta *Coffea* partió del trópico africano. En América, se introdujo durante el siglo XVIII, la planta se propagó por el Caribe y el continente. En 1727 fue introducido en Brasil y en 1731 a Jamaica y Santo Domingo, de donde se extendió al resto de los actuales países productores de América. Con la revolución industrial y el crecimiento de la población mundial durante el siglo XX, el café prácticamente se convirtió en una bebida universal (Temis *et al.*, 2011).

3.2. Enfermedades del cultivo de café

La biodiversidad microbiana presente en los frutos y los granos de café depende de la variedad de café, el método de procesamiento, el medio ambiente (factores de la región en la actualidad que se cultivan como humedad y temperatura) y el suelo (Temis *et al.*, 2011).

El cultivo de café es afectado en su mayoría por enfermedades de origen fúngico, dentro de las enfermedades más importantes se encuentran “la roya del café” causada por el patógeno *Hemileia vastatrix*, que se caracteriza por la aparición de manchas de coloración anaranjada y de apariencia polvosa en el envés de las hojas que luego originan la caída prematura de las hojas (Silva *et al.*, 2008).

La enfermedad comúnmente conocida como “la mancha de hierro” causada por el hongo fitopatógeno *Cercospora coffeicola*, que ataca a las plantas de café en cualquier etapa del desarrollo, caracterizándose por la aparición de pequeñas manchas circulares de color marrón rojizo; y “el Ojo de Gallo del café” causado por *Mycena citricolor* que produce en las hojas manchas más o menos circulares de un color café oscuro y que en ataques fuertes causa la pérdida de gran parte de la superficie foliar de las plantas (Backman y Sikora, 2008).

La pudrición del cuello (*Rhizoctonia solani*) que se presenta en germinadores y a veces en almácigos como una mancha negra en el tallo a nivel del suelo que luego se extiende, ocasiona marchitez y muerte de las plántulas (Backman y Sikora, 2008).

“La antracnosis” provocada por *Colletotrichum kahawae* (originalmente designado como *Colletotrichum coffeanum*) que infecta desde flores hasta los frutos maduros y hojas, causa pérdidas al infectar los granos verdes con la formación de lesiones oscuras hundidas que producen la caída prematura y la momificación de los frutos, esta enfermedad está presente en todo el desarrollo de la planta (Silva *et al.*, 2008).

3.2.1. Tabla de evaluación de grado de incidencia para determinar la patogenicidad de antracnosis (*Colletotrichum coffeanum*).

| Grado | Hongo patógeno | Escala | Porcentaje de daño en la planta |
|-------|---------------------------------|----------|---------------------------------|
| 1 | <i>Colletotrichum coffeanum</i> | 0 - 3 | 5 % |
| 2 | <i>Colletotrichum coffeanum</i> | 3 - 6 | 10% |
| 3 | <i>Colletotrichum coffeanum</i> | 7 - 12 | 20% |
| 4 | <i>Colletotrichum coffeanum</i> | 13 - 25 | 30% |
| 5 | <i>Colletotrichum coffeanum</i> | 26 - 50 | 50% |
| 6 | <i>Colletotrichum coffeanum</i> | 51 - 100 | 100% |

Fuente: (Silva et al., 2008).

3.3. Origen y evolución de los hongos endófitos

Los hongos endófitos son organismos que viven en asociación con las plantas en la mayor parte o en todo su ciclo de vida, y se encuentran en hojas, tallos de muchas plantas, son simbioses, no producen síntomas de enfermedad en la planta, aunque algunas veces pueden presentar un grado de patogenicidad leve, estando relacionados taxonómicamente con los hongos fitopatógenos, que viven en los espacios intercelulares y, algunas veces, intracelularmente en hojas, tallos y flores, absorbiendo nutrientes de la plantas, en algunos casos, los hongos endófitos confieren beneficios a la planta que pueden resultar mutuos, los hongos endófitos utilizan los nutrientes que sintetiza la planta y ésta se beneficia de los metabolitos bioactivos que ellos producen (Rodríguez, 2005)

3.3.1. Generalidades de los hongos endófitos

El primer descubrimiento de un hongo endófito se realizó en 1904, este grupo de microorganismos no recibió demasiada atención hasta que se puso de

manifiesto su papel ecológico y su potencial para producir metabolitos secundarios, muchos de ellos con nuevas estructuras químicas (alcaloides, esteroides, terpenoides, flavonoides, glucósidos, lignanos, lactonas, etc.) con un amplio rango de actividades biológicas (antifúngica, antibiótica, insecticida, anticancerígena, antioxidante (Rodríguez, 2005).

Las primeras evidencias de asociación entre microorganismos endófitos y plantas, se originaron observaciones en tejidos y hojas fosilizadas, lo que soporta la inferencia de que la asociación planta - endófito pudo haber ocurrido junto con la aparición de las primeras plantas en la tierra (Strobel y Long, 1996).

Los hongos endófitos son microorganismos que pasan la mayor parte o todo su ciclo de vida colonizando los tejidos de las plantas, sin causar daño o síntomas aparentes de enfermedad sobre su huésped, se localizan en los espacios intercelulares de los tejidos vegetales como en el interior de las células simplasto (Rodríguez, 2005)

La mayoría de los hongos endófitos se transmiten horizontalmente, mediante la producción de esporas externas, se dispersan por el aire infectando otras plantas, es menos frecuentemente a través de semillas infectadas a otras generaciones de plantas por una transmisión vertical, Para que ambos organismos coexistan se establece entre ellos una interacción de antagonismo, que permite la supervivencia de ambos organismos, que depende de la virulencia del hongo, de las defensas de la planta, se

encuentran influenciadas por los factores ambientales y la etapa de desarrollo de ambos organismos, El beneficio de esta asociación, la planta protege y proporciona nutrientes al endófito para que éste complete su ciclo de vida (Rodríguez, 2005).

El hongo endófito produce fitohormonas que aumenta el desarrollo de la planta huésped y productos naturales que juegan un papel importante en su defensa bioquímica o metabólica (Agrios, 2005).

Como consecuencia de esta interacción endófito - planta, se ha observado varios efectos que mejoran la adaptación ecológica de la planta al ecosistema en el que habita, al aumentar su tolerancia al estrés, a cambios de temperatura y salinidad, su resistencia frente a enfermedades, insectos, nematodos, bacterias y hongos patógenos (Rodríguez, 2005).

Los hongos endófitos representan uno de los grupos más importantes de la biodiversidad microbiana, se han aislado de diferentes órganos de las plantas y diversos rangos de huéspedes en el Ártico y ambientes séricos hasta bosques templados y tropicales; se estima que cada una de las 300 mil especies de plantas que existen en el planeta es huésped de uno o varios endófitos, y de todos los ecosistemas terrestres, los bosques templados y tropicales parecen albergar mayor cantidad de estos hongos, la mayoría pertenece al *phylum Ascomycota*, aunque también se han encontrado en los *Basidiomycota*, *Zygomycota* y *Oomycota* (Silva, 2008).

3.4. Ecología de los hongos endófitos

La planta es un hábitat dinámico en que diversos factores pueden influenciar la estructura y la composición de la comunidad bacteriana, en cultivos in vitro de tomate, la colonización de las bacterias endófitas varían con las alteraciones de la densidad de inóculo, temperatura de cultivo y genotipo de hospedero, las variaciones estacionales, el tipo de tejido vegetal especie y cultivares de hospedero, la interacción con otros microorganismos benéficos, también pueden influenciar el patrón de colonización (Bonilla, 1980).

3.5. Consideraciones generales sobre los hongos

Los hongos habitan en el interior de las plantas durante todo o parte de su ciclo de vida sin causarles síntomas aparentes, se conoce de la existencia de este tipo de hongos desde finales del siglo XIX, hongos en el interior de semillas de cizaña (*Lolium temulentum*), estos hongos no recibieron especial atención hasta el siglo XX, fue precisamente en 1977 que se impulsó el estudio de los endófitos, las toxicosis observadas en ganado vacuno estadounidense, eran debidas al consumo de plantas de *Lolium arundinaceum*, cuyas hojas y tallos estaban infectados sistémicamente por el hongo *Neotyphodium coenophialum*, sin que las plantas mostrasen ningún síntoma (Bacon *et al*, 2000).

Pueden ser hospedadores de más de 100 especies diferentes de hongos, son precisamente los hongos aislados de estas y otras gramíneas, los que se utilizaron para el análisis de incidencia de micovirus en el grupo de hongos endofíticos no sistémicos de gramíneas (Bacon *et al*, 2000).

Los endófitos son ubicuos en el reino vegetal, en los últimos años se han llevado a cabo numerosos estudios su incidencia, y todos ellos parecen apuntar a que la mayoría de las especies vegetales presentes tanto en comunidades naturales como antropogénicas, extendidas desde el ártico a los trópicos, son hospedadoras de estos hongos (Arnold, 2000).

La relación entre las plantas y los hongos parecen datar de muy antiguo, el registro fósil indica que estas asociaciones pudieron comenzar hace más de 400 millones de años, en la era Paleozoica, este hecho revela la importancia de estas asociaciones planta - hongo, pues en términos evolutivos los hongos podrían llevar ligados a las plantas desde que éstas dieron el salto a tierra y la colonizaron, desempeñando desde entonces un papel crucial en la evolución de las plantas en el medio terrestre, por este motivo, se cree que los hongos mantienen en ocasiones asociaciones mutualistas con sus hospedadores, establecidas posiblemente gracias a un proceso de coevolución (Bacon y Hill 1995).

3.6. Naturaleza de la interacción planta - hongo endófito

La hipótesis mutualista. ¿Cómo saber si una relación entre una planta y un hongo endófito es mutualista? en tal situación la eficiencia (capacidad de sobrevivir y reproducirse), de cada uno de los miembros debería ser mayor cuando están asociados que cuando están viviendo libremente, sin embargo, esto no es fácil de probar, dado que en algunos casos el componente fúngico de esta simbiosis no vive o es difícil de encontrar libre en la naturaleza, Algunos pastos y hogos endófitos de las zonas templadas constituyen un

modelo ampliamente estudiado, del cual proviene la mayor evidencia para postular que esta relación es mutualista, los estudios pioneros son de la zona templada y sirven como marco de referencia (Claus *et al.*, 2007).

El efecto protector de los endófitos sobre pastos de zona templada, ha sido reportado por Claus *et al.* 2007, quien usó como herbívoros especies de áfidos y larvas de mariposa, respectivamente, en ambos casos, la mortalidad del herbívoro fue mayor cuando se alimentaba de plantas infectadas, aunque se pudieron detectar efectos variados de acuerdo a la combinación áfido - planta, también se han postulado otros beneficios para la planta hospedera de endófitos, como el aumento en el crecimiento de las plantas infectadas aun en ausencia de herbivoría y una mayor resistencia a hongos patógenos, aunque los estudios demuestran claramente que los endófitos causan efectos negativos en los herbívoros siendo de aceptación general el postulado de un mutualismo basado en la defensa contra herbívora, recientemente se ha cuestionado la significancia de estos hallazgos en sistemas naturales (Johnson, 2001).

3.7. Microorganismos endófitos en plantas de café

Los estudios referentes a microorganismos endófitos en plantas de café han sido muy pocos, más las investigaciones apuntan a la agrupación benéfica de microorganismos especialmente bacterias que colonizan nichos internos en las plantas y que desarrollan una interacción simbiótica (Mariño, 2007).

El papel de los hongos endófitos dentro de las plantas aún es poco conocido; sin embargo, se le han asignado funciones benéficas en cuanto al combate de patógenos que luchan por el mismo nicho ecológico a través de competencia, antibiosis o estimulación de las defensas y crecimiento de los hospederos, aceleración de emergencia de raíces, aumento en la capacidad de absorción y asimilación de nutrientes, estos endófitos no causan un daño visible a la planta y se pueden recuperar de los tejidos internos de está considerándose una fuente potencial de biocontrolador (Araujo *et al.*, 2007).

En la especie de *Coffea arábica* la incidencia de 87 aislamientos bacterianos agrupados dentro de 19 géneros obtenidos a partir de tejido de hojas, raíces, tallos y frutos en donde se incluyen los géneros *Bacillus*, *Burkholderia*, *Clavibacter*, *Curtobacterium*, *Escherichia*, *Micrococcus*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Serratia* y *Stenotrophomas* como los más abundantes (Vega *et al.*, 2005).

Existen trabajos enfocados en la comparación de hongos endófitos con las de epífitos sobre las hojas de cafetos realizando comparaciones de la diversidad y correspondencia de microorganismos en ambos nichos; por ejemplo aislaron en café 831 colonias y las agruparon en 131 morfoespecies, luego de la aplicación de análisis moleculares de secuenciación de ITS se determinaron los géneros de *Colletotrichum*, *Xylaria* y *Guignardia* dentro de los endófitos más abundantes contrastados los epífitos *Pestalotia* y *Botryosphaeria* (Teng *et al.*, 2006).

3.8. Investigaciones con hongos endófitos

En los ensayos de control biológico en pimiento ejercido por *Trichoderma harzianum* sobre *Phytophthora capsici* (podredumbre de pimiento), se ha optimizado la producción de la biomasa del antagonista *Trichoderma harzianum* al comparar su desarrollo en tres diferentes medios y soportes de cultivo. El método de producción de la biomasa de *Trichoderma harzianum* fue en Agua-Avena-Vermiculita resultó ser el más rentable por su rápido y abundante crecimiento, viabilidad y bajo coste para utilizarlo como inóculo del suelo, al compararlo con los crecidos en Czapek líquido y PDB. El test del antagonismo in vitro de *Phytophthora capsici* frente a *Trichoderma harzianum* en medio PDA enriquecido con Laminarina-glucosa, mostró que *Trichoderma harzianum* aumenta los niveles de enzimas hidrolíticas β -1,3- glucanasa, ejerce una mayor competencia por espacio y nutrientes e interacciona directamente con el patógeno, todo lo cual juega un papel importante en la reducción y destrucción de la colonia del patógeno. En ensayos in vivo las plantas crecidas a partir de semillas tratadas mostraron un peso seco superior a al testigo, en definitiva, el tratamiento con *Trichoderma harzianum* ha sido capaz de reducir hasta un 65% la «tristeza» causada por el patógeno *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (Ezziyyani *et al.*, 2004).

Los aislamientos fúngicos que se identificaron mediante la presencia de estructuras reproductivas en la finca con sintomatología de “Ojo de gallo” las bacterias epífitas más abundantes fueron *Chryseobacterium* sp, para muestras de plantas sintomáticas, y *Bacillus amyloliquefaciens* y *Chryseobacterium* sp para plantas asintomáticas, mientras que *Bacillus*

amyloliquefaciens junto a *Ralstonia* sp, y *Raoutella terrigena* junto a *Ralstonia* sp. Fueron las bacterias endófitas más representativas en plantas asintomáticas y sintomáticas, para la finca con sintomatología de “Crespera” las bacterias epífitas más frecuentes correspondieron a *Enterobacter cloacae* para plantas asintomáticas y a *Ralstonia* sp y *Enterobacter cloacae* para muestras sintomáticas, mientras que solo se obtuvo bacterias endófitas a partir de plantas sintomáticas correspondiendo los aislados a *Tsukamurella inchoensis* y *Staphylococcus* sp, en ambas localidades los aislados fúngicos estuvieron representados por el género *Cladosporium* y una gran cantidad de hongos no esporulados. Las diferencias en la cantidad y diversidad de los aislados tanto epífitos como endófitos entre las dos zonas de muestreo evidencian la influencia de factores ambientales locales sobre las microfloras presentes en las hojas, de los 59 aislados (hongos, levaduras y bacterias) ensayados *in vitro* contra *Mycena citricolor* cepa My1 solo el de ID B10, correspondiente a una bacteria, presentó un efecto inhibitorio significativo del crecimiento de dicho hongo, el método de cultivo dual en placa y el período de incubación por 15 días resultaron efectivos para la observación de potencial antagónico de los aislados, así como para el descarte de aislados con un efecto inhibitorio temporal (Salas, 2010).

Trigozo, (2012), en el estudio sobre la resistencia de plántulas de cacao al estrés hídrico, concluye lo siguiente. El uso de *Trichoderma* spp podría ser una alternativa para dar solución a estos problemas, ya que existen reportes donde indican que estos microorganismos tienen la capacidad de crear resistencia al estrés hídrico en la planta, la mayor colonización endofítica en

plantas de cacao se presentó con el M1 con 63,54% y los aislamientos TE-39 (80,21%) y TE-50 (78,13%) fueron los que mejor colonizaron, las plantas inoculadas con *Trichoderma* mediante el M1 presentaron menor GM, mayor tasa absoluta de crecimiento radicular (TAC-R), LR, sin embargo, en el M2 se obtuvo mayor porcentaje de agua. Las plantas colonizadas con TE-17 presentaron menor GM (0,91), a los 6 DDSE, seguido de TE-22, TE-50, TE-20, TE-126, TE-74, TE-3, TE-39, TE-72 y TE-105 obtuvieron grados comprendidos entre 2,35 a 2,95 a comparación del control (sin agua) que obtuvo un GM de 3,2. Sin embargo, a los 9DDSE TE-17 (2,53) fue el único que generó menor GM en comparación al control (5). Con respecto a la tasa absoluta de crecimiento (TAC), los aislamientos TE-126, TE-54 y TE-39 generaron mayor TAC-R superiores al control sin agua; los aislamientos TE-17 y TE-126 generaron mayor tasa absoluta de crecimiento aéreo (TAC-A). En los resultados de porcentaje de agua en raíz (%A-R) y parte aérea (%A-A) indican que a los 6 y 9 DDSE, TE-17 (%A-A=63,57%, %A-R=59,99%) generó mayor %A superando al control (%A-A=45,97%, %A-R=56,67%). Sin embargo, TE-54 (510,92 cm), TE-3 (499,56 cm) y TE-105 (480,23 cm) generaron mayor LR superando a los controles comprendidos entre 415,62 a 476,86 cm.

IV. MATERIALES Y METODOS

4.1. Materiales.

4.1.1. Ubicación del trabajo de investigación.

El trabajo de investigación se desarrolló en el Laboratorio de Sanidad Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias, ubicado en la Ciudad Universitaria de la Universidad Nacional de San Martín (UNSM – Tarapoto) en el distrito de Morales, provincia de San Martín, departamento de San Martín, por un periodo de 12 meses. A una altitud de 295 m.s.n.m.m., latitud sur 06° 29' 40", longitud oeste 76° 27' 55". La recolección de muestras se realizó en el distrito de San Roque de Cumbaza, provincia de Lamas, departamento de San Martín a una altitud de 599 m.s.n.m.m., latitud sur 06° 23' 11", longitud oeste 76° 26' 31"



Figura 1: a) Laboratorio de Sanidad Vegetal, b) Cabina de flujo laminar, c) Planta de café del predio chontal en San Roque de Cumbaza.

4.2. Metodología para identificar la diversidad micobiótica endófitas en café procedente del sector San Roque de Cumbaza.

4.2.1. Método del muestreo en campo.

El muestreo se hizo en 4 Has en el predio El Chontal del señor Álvaro Vázquez Hidalgo, ubicado en el distrito de San Roque de Cumbaza, donde

seleccionamos 100 plantas de café variedad catimor al azar, de siete años, sembrados en suelo franco arcilloso, de las cuales se coleccionamos muestras, cortando con una navaja esterilizada, 100 muestras de tallos, 100 muestras de hojas y 100 muestras de flores luego empacamos, etiquetamos y se transportó al laboratorio de Sanidad Vegetal de la Universidad Nacional de San.

4.2.2. Aislamiento de hongos endófitos.

Las muestras colectadas en campo aparentemente libre de enfermedades, fueron cortadas en tamaños de 10 mm x 10 mm y trocitos de 5 mm para tallos flores con una navaja desinfectado con alcohol al 96% y flameados en llamas.

4.2.3. Selección y colección de la muestra para encontrar *Colletotrichum Coffeanum*.

Fue colectado del mismo lugar descrito en el párrafo 4.2.1. Para la colección se seleccionaron las plantas enfermas con presencia de antracnosis, luego con una tijera previamente desinfectada se cortaron las hojas enfermas, la muestra se colectó de la parte media de la planta de café, y se colocó en sobres de papel rotuladas para ser trasladadas al laboratorio de Sanidad Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de San Martín.



Figura 2: a) Planta sana de café (sin síntomas de enfermedad), b) Desinfección de materiales con alcohol al 96%, c) Extracción de tallo sano, d) Corte del tejido sano con la ayuda de una navaja.

4.2.4. Preparación del medio de cultivo de Papa Sacarosa Agar

Se pesaron en una balanza de precisión 200 g de papa, 20 g de azúcar y 20 g de Agar Agar, las papas se cortaron en pequeños trozos, depositamos en un vaso de precipitación de 1000 ml, adicionamos 500 ml de agua destilada, se llevó al microondas para la cocción durante diez minutos, luego tamizamos para separar los trozos de papa y obtuvimos el caldo de papa, de esta manera se ha obtenido caldo de papa. En otro vaso de precipitación de 1000 ml depositamos 20 g de Agar Agar, al cual adicionamos 500 ml de agua, llevamos al microondas para diluirlo a 100°C aproximadamente. Luego mezclamos el caldo de papa y el Agar diluido, se adiciono agua destilada hasta completar los 1000 ml, seguidamente adicionamos 20 g de azúcar, obteniendo el medio de cultivo, se procedió a distribución en botellas de 325

ml, 200 ml de PSA. Colocamos las tapas de algodón y papel. Seguidamente se procedió a esterilizar a vapor húmedo en un autoclave a 120°C +/- a 18 lb por 20 minutos.

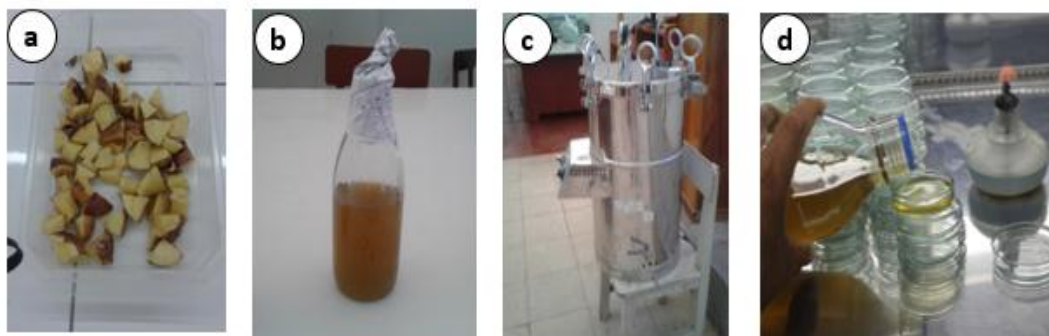


Figura 3: a) papa variedad cancha en trozos, b) Agar diluido + caldo de papa, c) Autoclave para esterilización del medio, c) Medio de cultivo en placas Petri.

4.2.5. Preparación del medio de cultivo de café para la prueba dual.

Papa Dextrosa Agar Café (APDC): Para la proporción de un litro de medio de cultivo, se cortó la papa en pequeños trozos y se cosió en un vaso de polycarbonato con agua destilada durante diez minutos, tamizamos para separar los trozos de papa y obtener el caldo de papa, en otro vaso de polycarbonato de 1000 ml se disolvió 20 g de Agar Agar a 100°C aproximadamente. El caldo de papa y el Agar diluido se mezclaron y adicionaron 10 g de glucosa agitándose hasta homogenizar. La papa dextrosa diluida, distribuimos 200 ml en botellas de vidrio de capacidad de 325 ml, se procedió a colocar tapas de algodón y luego capa de papel, inmediatamente esterilizamos a vapor de agua en la estufa de 100°C, 15 lb por 20 minutos.

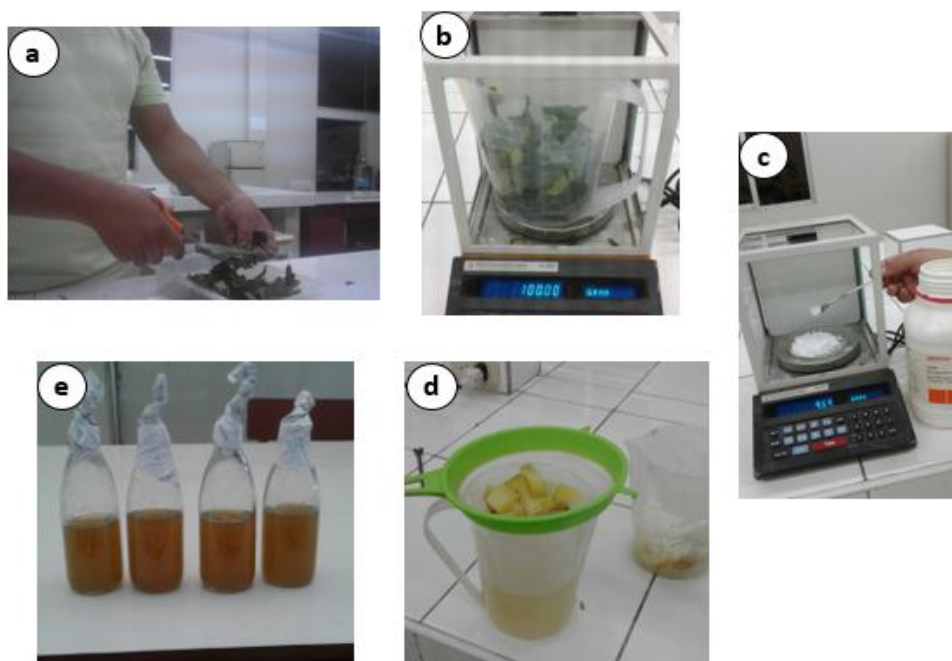


Figura 4: a) hojas de café cortados en cuadros pequeños, b) Pesado de hojas de café, c) Pesado de glucosa d) Cernido de caldo de papa, e) Envasado y tapado de medio en botellas.

4.2.6. Metodología para sembrar los tejidos de café.

En el laboratorio de Sanidad Vegetal- Fitopatología, las muestras de café colectadas de campo fueron cortadas en pequeños trozos, desinfectando con hipoclorito de sodio al 2%, durante dos minutos, se enjuagaron en agua destilada estéril y colocamos en una placa Petri conteniendo papel toalla para el secado. En la cámara de flujo laminar, bien esterilizada, procedemos a realizar la siembra, utilizando pinzas estériles colocando tres trozos pequeños por cada placa Petri, sellamos con paraflim luego etiquetamos con lapicero N° 0,5, luego incubando durante 30 días.

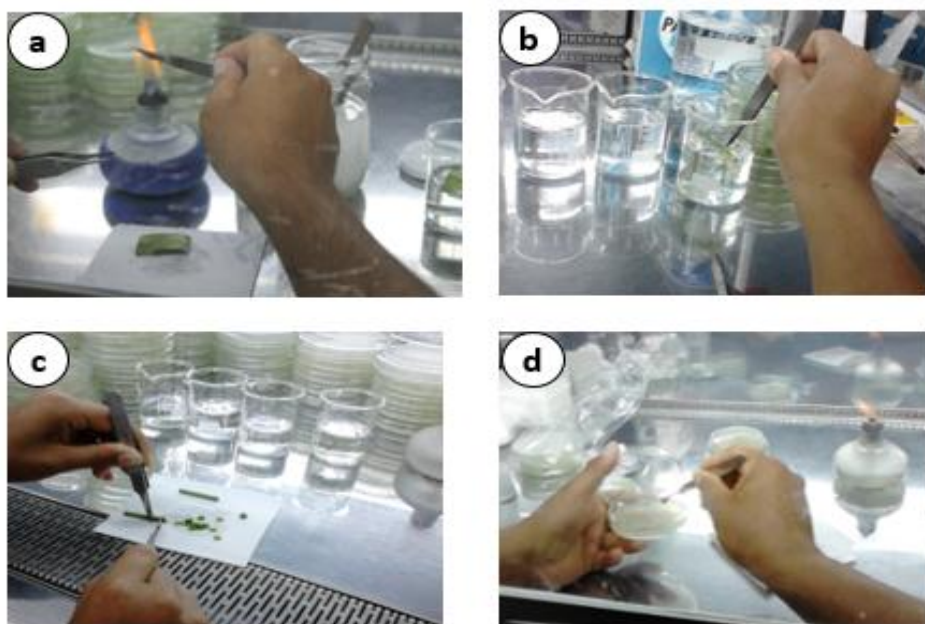


Figura 5: a) Flameado del bisturí en el mechero, b) Lavado de las muestras, c) Corte de las muestras (tallo), d) Siembra de las muestras en placas Petri conteniendo PDA.

4.2.7. Aislamiento, repique y conservación de hongos endófitos.

Los hongos encontrados en las muestras inicialmente sembradas se cultivaron en placas Petri conteniendo medio Papa Sacarosa Agar (PSA), y se dejó incubar a temperatura ambiente hasta obtener colonización del hongo, después se extrajo parte del micelio y fueron trasferidas a otra placa conteniendo el mismo medio de cultivo. Una vez aislada se utilizó para la conservación en tubos de vidrio que contienen solución Glicerol al 20% y a -20°C de temperatura, (refrigeración).

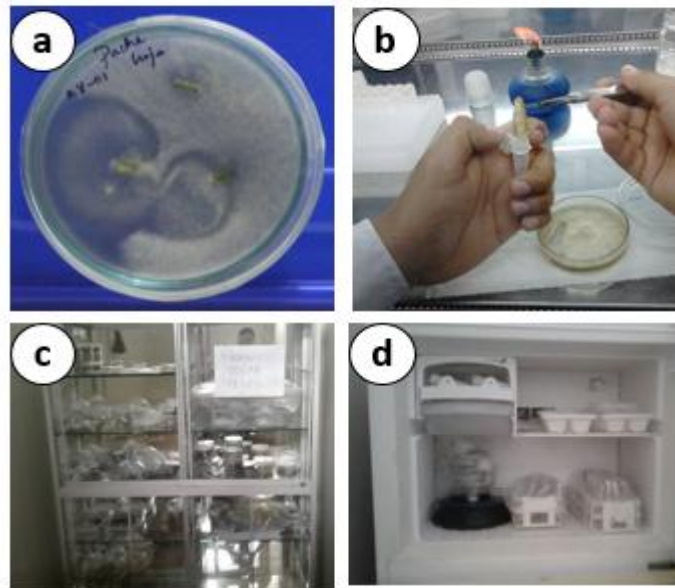


Figura 6: a) Colonización de hongos de los tejidos sembrados, b) Conservación de hongos en el refrigerador, c) Incubación de placas Petri conteniendo el hongo endófito, d) Refrigeración de tubos en conservación, se conservó *Colletotrichum coffeanum* obtenidas de las partes con síntomas de la enfermedad antracnosis del café.

4.2.8. Identificación de hongos endófitos.

Para la caracterización morfológica y biométricas, colocamos en un porta objeto en el porta objeto, colocamos una gota azul de algodón para hongos claros y lactofenol para hongos oscuros, con un estilete con alfiler W 0001, se tomó una pequeña porción del hongo purificado, desarrollado y se colocó sobre la gota del colorante, seguidamente protegemos con una lámina cubreobjetos, se calentó en el mechero hasta que se elimine el aire. Esta muestra montada se examinó en microscopio, primero 4X, 10X, 40X y 100X de aumento y ocular 10X. Para tener mejor observación se utilizó los objetivos 100X. Las estructuras observadas se describieron y se midieron en el

micrómetro ocular previamente calibrado con el macro metro de platino, con esta calculamos la medida de las conidias, clamidiosporas y micelio.

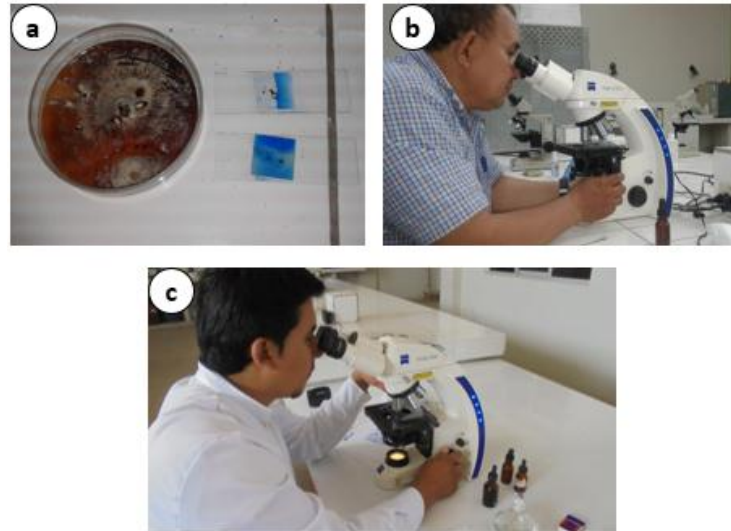


Figura 7: a) Tinción al micelio en la lámina porta objeto, b) y c) Observación de las estructuras morfológicas del hongo endófito para la identificación con la ayuda del microscopio, y recorriendo las claves para su identificación de los hongos endófitos

4.3. Determinar la capacidad de antibiosis e hiperparasitismo de cepas de hongos endófitos de café (*Coffea arabica* L.) sobre *Colletotrichum* sp.

4.3.1. Prueba dual para determinar hongos biocontroladores.

Para llevar a cabo las pruebas de biocontrol con cada uno de los microorganismos aislados sobre *Colletotrichum coffeanum* sembramos una muestra de 5mm de diámetro del hongo aislado en un extremo del medio (placa Petri) y al otro extremo 5mm de diámetro del hongo *Colletotrichum coffeanum*, sellamos y etiquetamos las pruebas duales y se encubran para

observar el crecimiento y determinar el comportamiento de estos hongos endófitos.

4.4. Diseño experimental.

Se aislaron ocho hongos endófitos, cada uno se convirtió en un tratamiento, en la prueba dual se realizó cinco repeticiones, en total sembramos 40 placas Petri.

Para la capacidad endofítica se evaluó las variables, área foliar y número de hojas, distribuidos bajo diseño completamente al azar (DCA) con dos repeticiones por tratamiento para el área foliar y número de hojas con tres repeticiones por tratamiento, procesados en un análisis de varianza al 1% y con una prueba de Duncan al 5%. Los datos fueron procesados en el programa estadístico informático SPSS 22.

4.4.1. Componentes del estudio.

Cuadro 1. Distribución de los componentes estudiados.

| variedad | Tratamiento | Hongos endófitos | Aislamiento |
|----------|-------------|--------------------------|-------------|
| Catimor | T1 | Control | CC |
| | T2 | <i>Trichoderma</i> sp | TRY |
| | T3 | <i>Aspergillus</i> sp | ASP |
| | T4 | <i>Verticilium</i> sp | VER |
| | T5 | <i>Thielaviopsis</i> sp | THIE |
| | T6 | <i>Scytalidium</i> sp | STA |
| | T7 | <i>Xylaria</i> sp | XYL |
| | T8 | <i>Nigrospora</i> sp | NIG |
| | T9 | <i>Pestalotiopsis</i> sp | PES |

4.5. Variables evaluadas.

4.5.1. Hiperparasitismo.

Se evaluó el crecimiento del micelio del hongo endófito en la placa Petri hasta que se observa interacción directa sobre *Colletotrichum coffeanum* el cual redució la capacidad infectiva del hongo, durante el tiempo en que los hongos colonicen toda la placa (hongo endófito - *Colletotrichum coffeanum*).

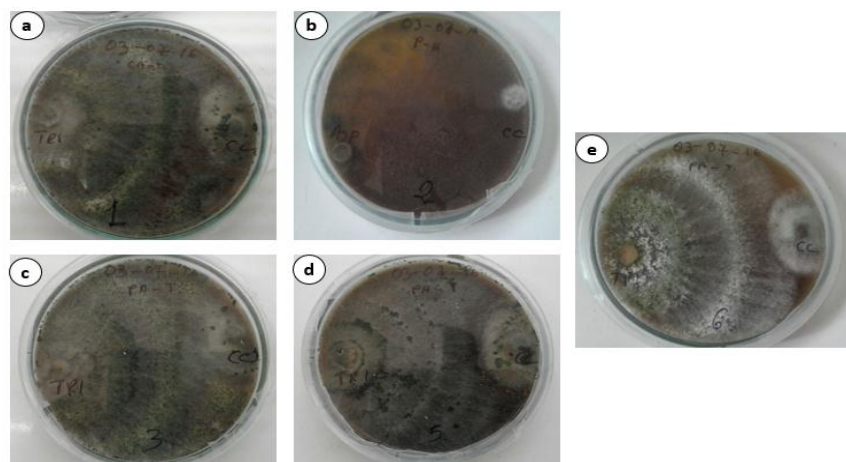


Figura 8: a), b), c), d) y e), se observa hiperparasitismo, donde se observa que el hongo endófito se desarrolla sobre *Colletotrichum coffeanum*.

4.5.2. Antibiosis.

Evalúamos la antibiosis, que consistió en observar, el detenimiento de crecimiento del hongo *Colletotrichum coffeanum* por compuestos difusibles de bajo peso molecular o antibióticos que produce el hongo endófito, los micelios no interactuaron directamente, existe una frontera entre ellos, como una banda de separación.

4.5.3. Medición lineal de colonias.

Se delineó desde la parte central de la placa en forma de cruz, luego con la ayuda de una regla milimetrada se midió de izquierda a derecha el avance de la colonia del hongo, para determinar crecimiento lineal.

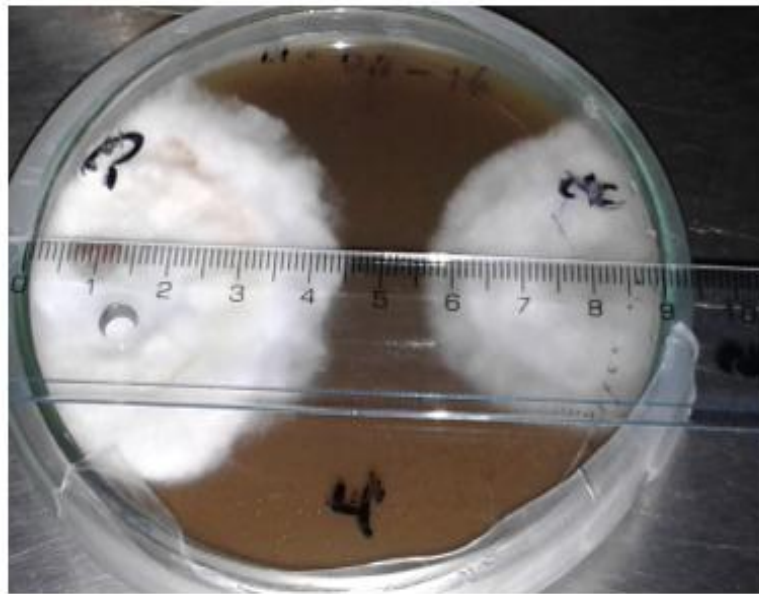


Figura 9: Medición lineal de colonias a través de una regla milimetrada horizontal.

4.6. Determinación de la capacidad endófitica de los hongos aislados en plántulas de café.

4.6.1. Preparación de plantas aisladas.

Se seleccionaron las plantas sanas, eliminando las hojas viejas, dejando las hojas nuevas, observando que no tenga ninguna presencia de enfermedad.

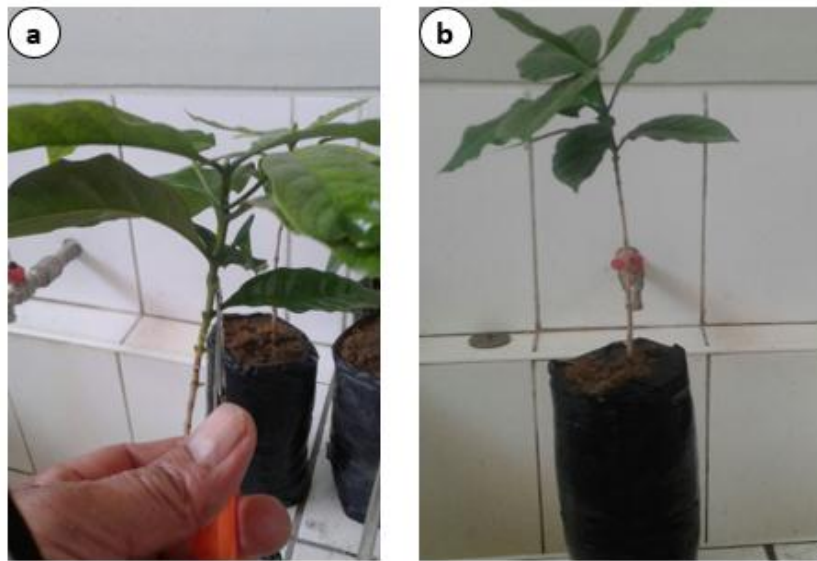


Figura 10: Cortado de hojas: a) Eliminación de hojas viejas, con síntomas de enfermedades, b) Plántula sin presencia de enfermedades.

4.6.2. Colonización de hongos endófitos en plántulas de café.

A la placa con el hongo endófito se incorporó 10ml de ADE y con una bagueta se hizo un raspado para liberar las conidias del micelio, después esta suspensión fue diluida en 20ml de ADE en un tubo de ensayo, seguidamente se colocó al agitador orbital para liberar las conidias, con una micro pipeta se extrae 1ml para cuantificar la concentración de conidias por centímetro cúbico (cc) de agua en la cámara de Neu Bauer. Con la ayuda de un Flex se inoculó la suspensión de conidias a la planta a una concentración de 1/100, cubriéndole después con una bolsa estéril. Estas plantas inoculadas fueron incubadas a temperatura ambiente, al alcance de la luz solar en condiciones de laboratorio durante 30 días.



Figura 11: Colonización de hongos endófitos en plántulas de café, a) Raspado para la liberación de conidias, b) Colocación de una parte del micelio al tubo de ensayo, c) Agitador para liberar conidias, d) Colocación de la acuícula en cámara de Neu Bauer, e) Conteo de conidias en el microscopio, f) Inoculación de los hongos endófitos a las plantas (1×10^6 ufc/cc), g) Embolsado y rotulado a plántulas de café, e) Plántulas en incubación durante 30 días en condiciones de laboratorio con agua y luminosidad adecuada para el crecimiento de las plántulas de café.

4.6.3. Evaluación del área foliar.

Para calcular el área foliar, expresado en cm^2 , multiplicamos la longitud por ancho de la hoja por un factor de corrección estimado a 0.75, (CIAT, 1998). Cada tratamiento tuvo cuatro hojas, se evaluó después de 30 días de haber inoculado el hongo endófito

4.6.4. Número de hojas.

Se contabilizó el número de hojas por planta, después de 30 días de haber inoculado a las plántulas de café con cada hongo endófito identificado, con tres repeticiones por tratamiento.

V. RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1. Resultados.

5.1.1. Identificación de la diversidad micobiótica endófitra en café procedente del sector San Roque de Cumbaza.

5.1.1.1. *Trichoderma* sp

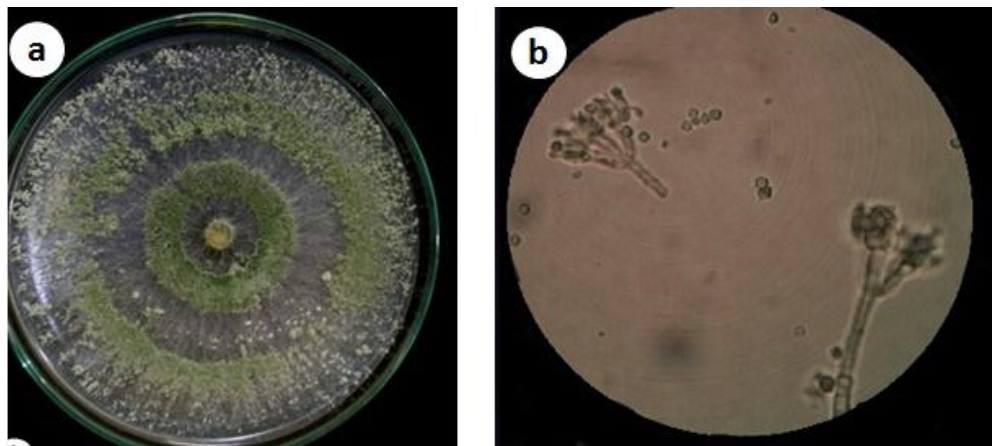


Figura 12: Características de *Trichoderma* sp, a) Colonia en APDC de color verde, b) Características morfológicas a 40X.

5.1.1.2. *Aspergillus* sp

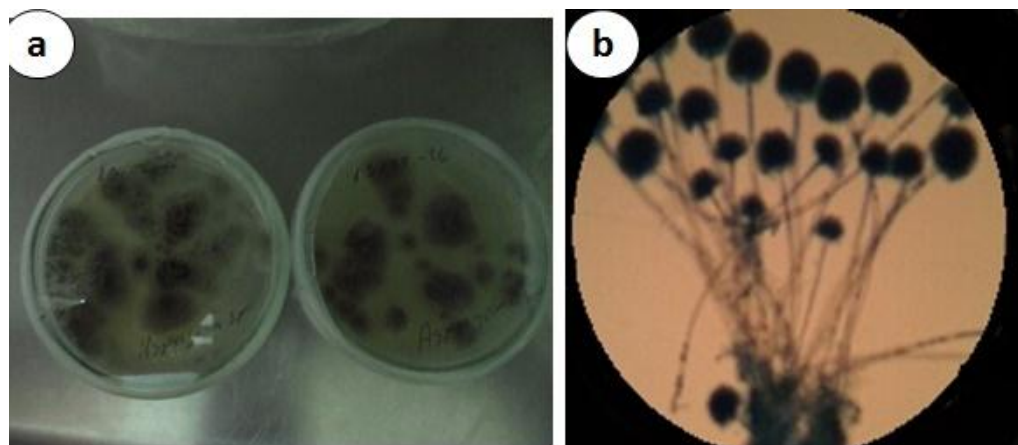


Figura 13: Características de *Aspergillus* sp, a) Colonia en APDC, b) Características morfológicas a 40X.

5.1.1.3. *Verticillium* sp

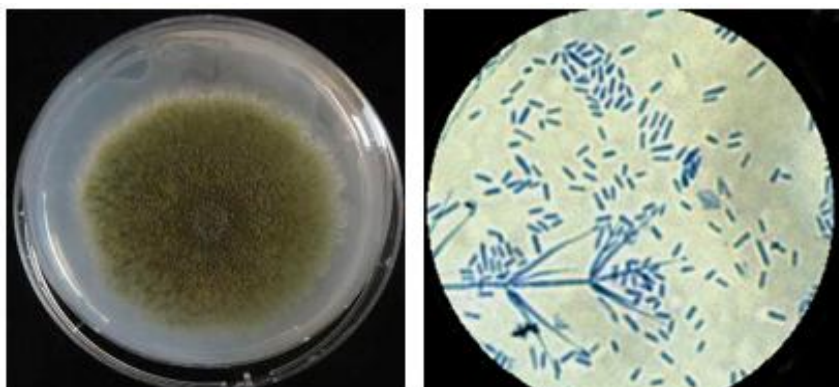


Figura 14: Características de *Verticillium* sp, a) Colonia en APDC, b) Características morfológicas a 40X.

5.1.1.4. *Thielaviopsis* sp

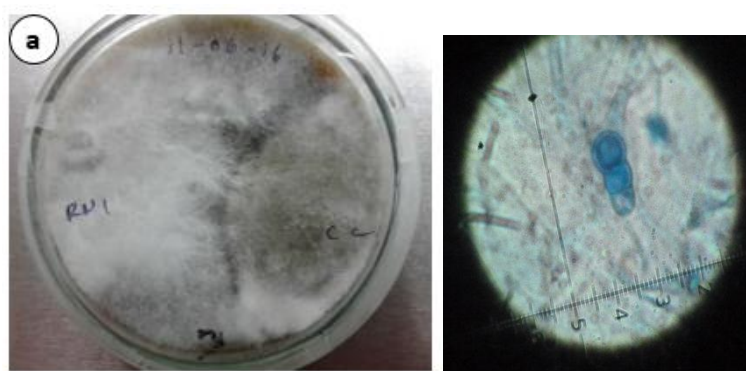


Figura 15: Características de *Thielaviopsis* sp. a) Colonia en APDC, b) Características morfológicas a 40X.

5.1.1.5. *Scytalidium* sp

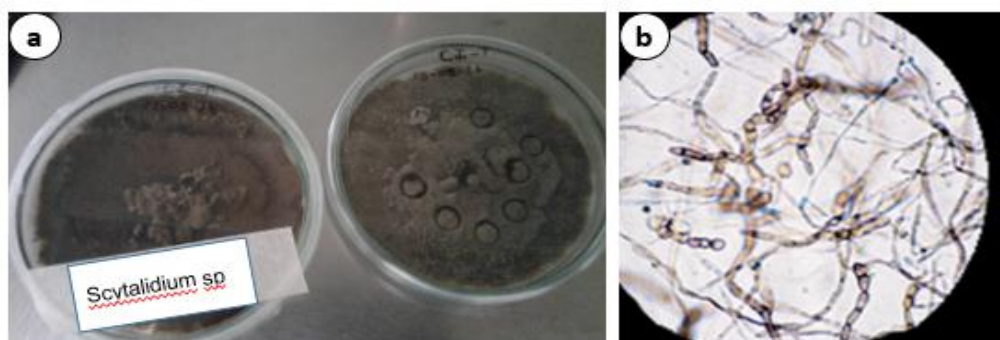


Figura16: Características de *Scytalidium* sp. a) Colonia en APDC, b) Características morfológicas a 40X.

5.1.1.6. *Xylaria* sp

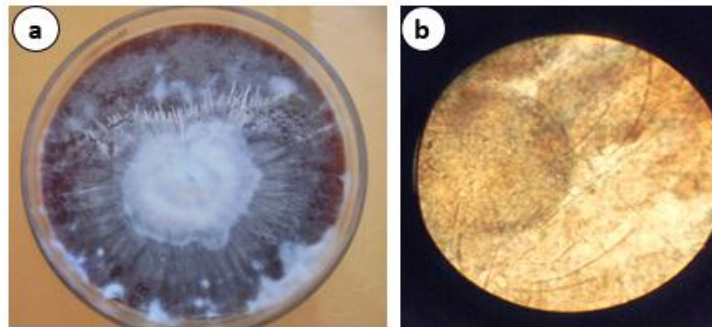


Figura 17: Características de *Xylaria* sp. a) Colonia en APDC, b) Características morfológicas a 40X.

5.1.1.7. *Nigrospora* sp

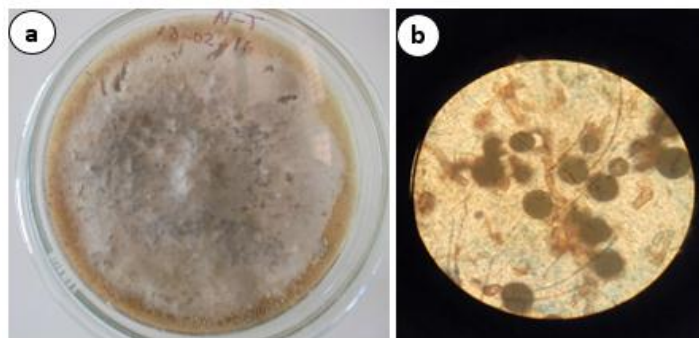


Figura 18: Características de *Nigrospora* sp. a) Colonia en APDC, b) Características morfológicas a 40X.

5.1.1.8. *Pestalotiopsis* sp

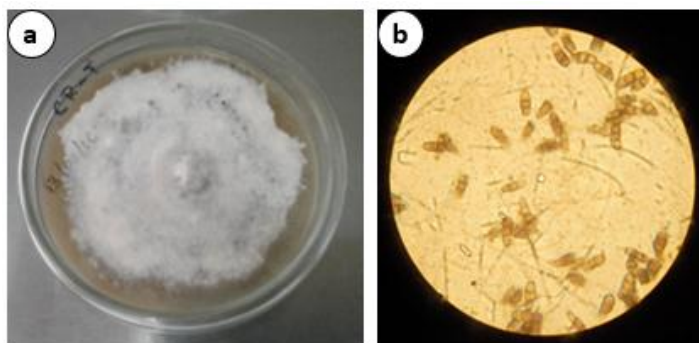


Figura 19: Características de *Pestalotiopsis* sp. a) Colonia en APDC, b) Características morfológicas a 40X.

5.1.2. Determinación de la capacidad de antibiosis e hiperparasitismo de cepas de hongos endófitos de café contra *Colletotrichum coffeanum* con la prueba dual.



Figura 20: Colonización de hongos endófitos, se puede observar la colonización de los endófitos en estudio, Trich (*Thychoderma* sp), Asper (*Aspergillus* sp), vert (*Verticilium* sp), Thiel (*Thielaviopsis* sp), Scyt (*Scytalidium* sp), Xylar (*Xylaria* sp), Nigr (*Nigrospora* sp), Pesta (*Pestalotiopsis* sp).

5.1.2.1. Prueba dual (evaluación de antibiosis e hiperparasitismo).

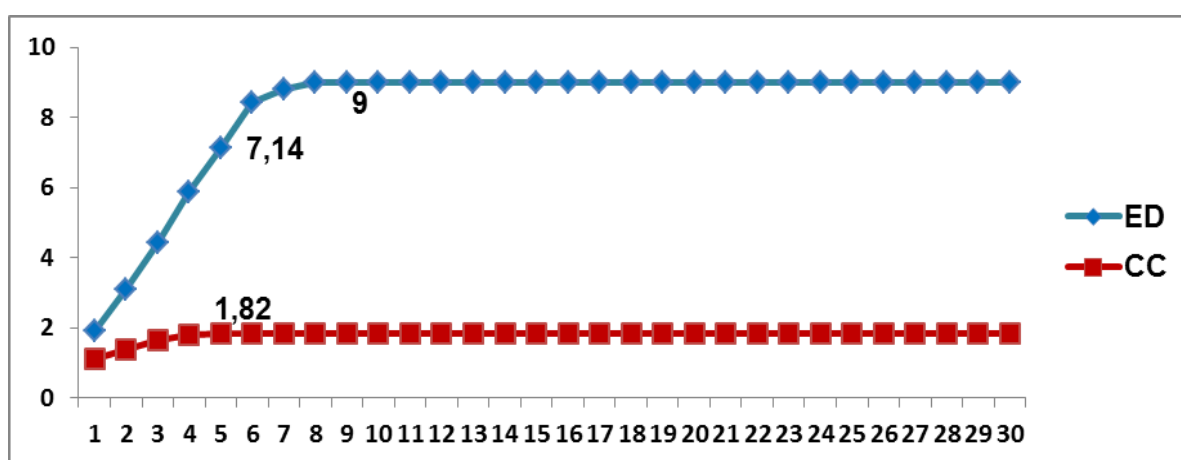


Figura 21: Crecimiento lineal de la colonia, prueba dual (hiperparasitismo), para *Trichoderma* sp - *Colletotrichum coffeanum*.

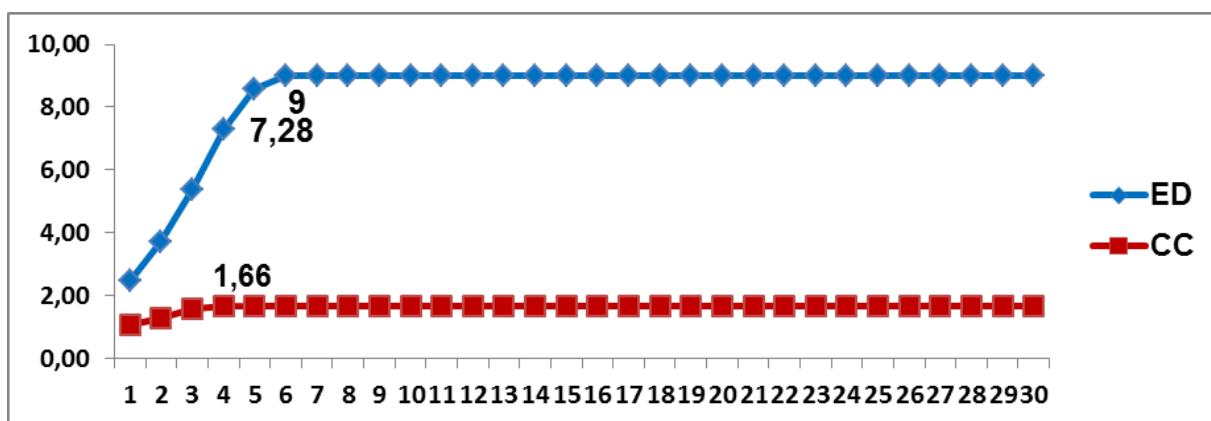


Figura 22: Crecimiento lineal de la colonia, prueba dual (hiperparasitismo) para *Aspergillus* sp - *Colletotrichum coffeanum*.

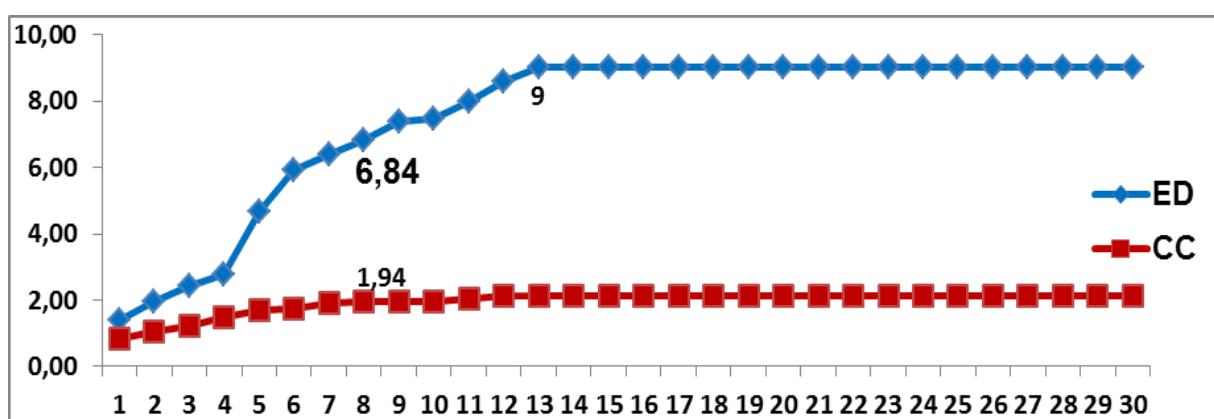


Figura 23: Crecimiento lineal de la colonia, prueba dual (hiperparasitismo) para *Verticilium* sp - *Colletotrichum coffeanum*.

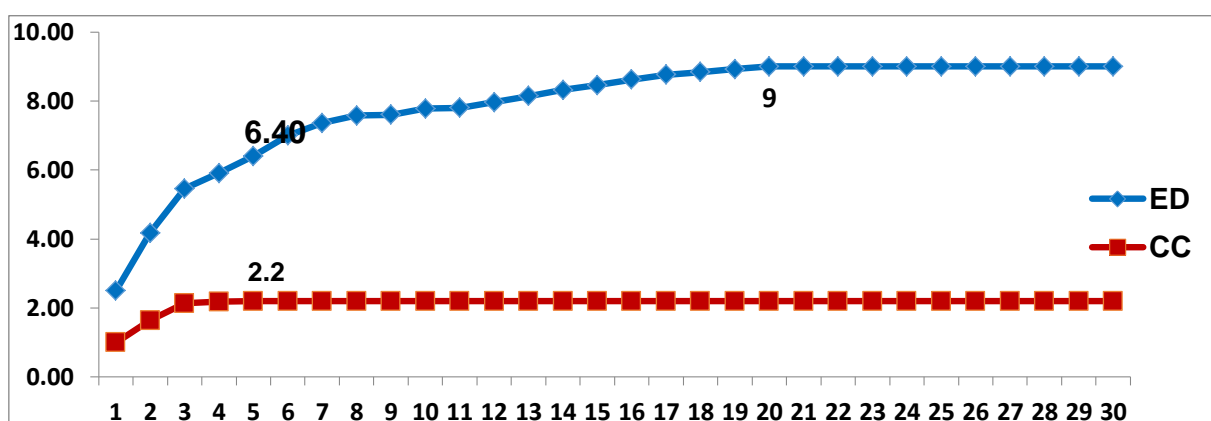


Figura 24: Crecimiento lineal de la colonia, prueba dual (hiperparasitismo) para *Thielaviopsis* sp - *Colletotrichum coffeanum*.

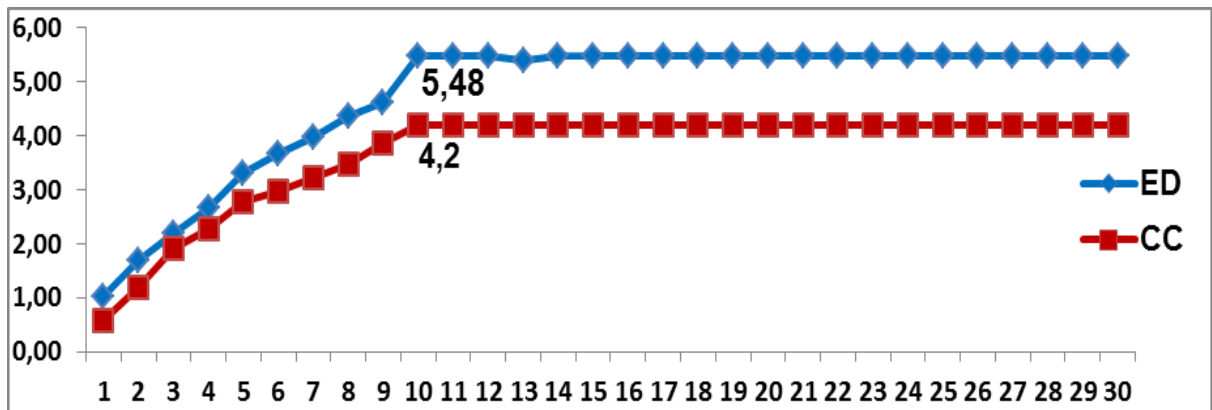


Figura 25: Crecimiento lineal de la colonia, prueba dual (antibiosis) para *Scytalidium* sp - *Colletotrichum coffeanum*.

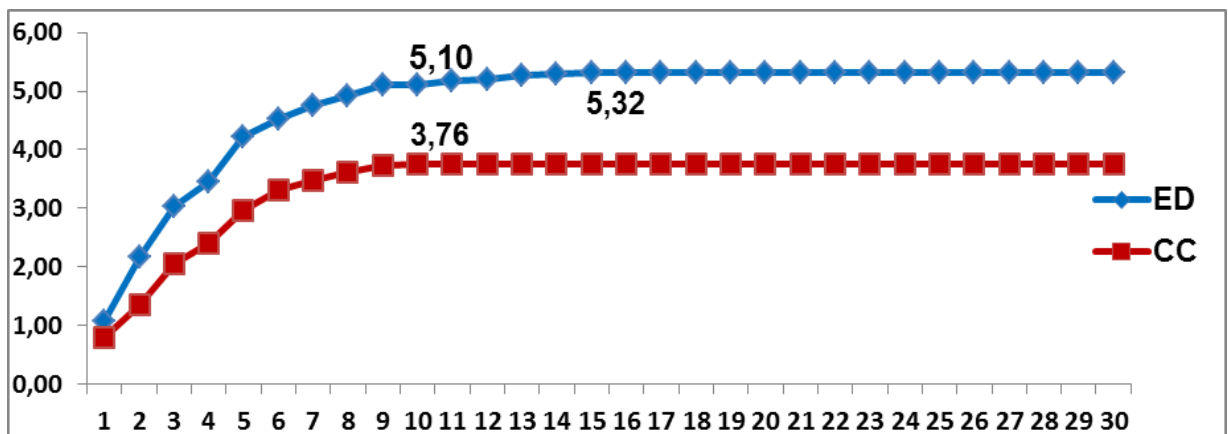


Figura 26: Crecimiento lineal de la colonia, prueba dual (antibiosis) para *Xylaria* sp - *Colletotrichum coffeanum*.

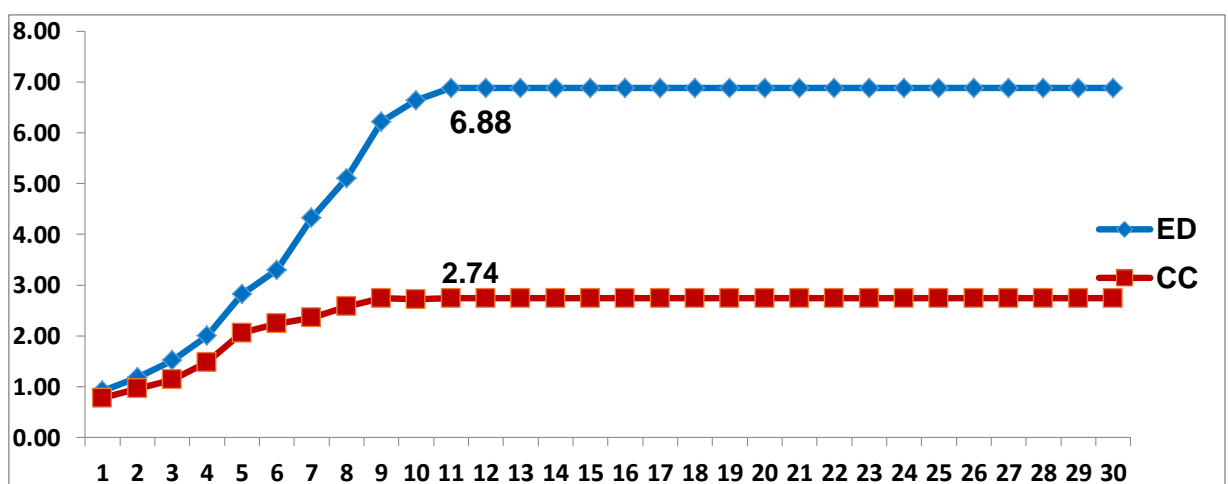


Figura 27: Crecimiento lineal de la colonia, prueba dual (hiperparasitismo) para *Nigrospora* sp - *Colletotrichum coffeanum*.

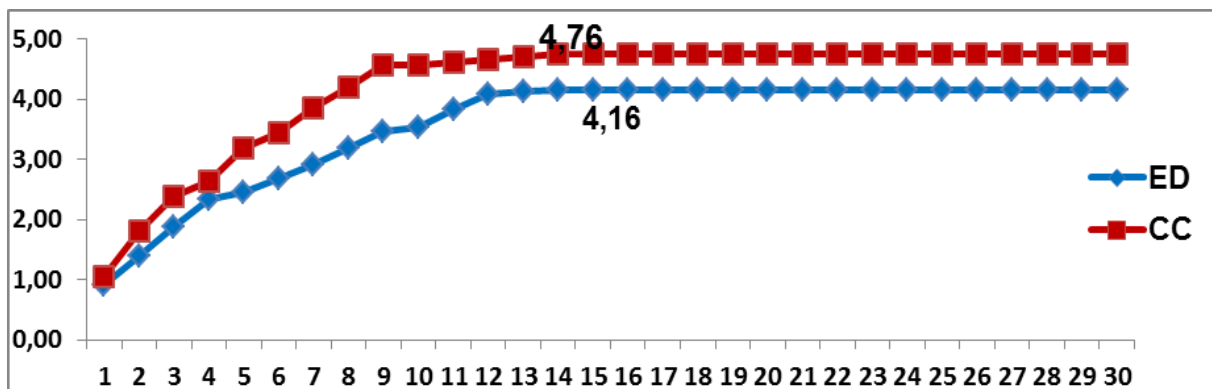


Figura 28: Crecimiento lineal de la colonia, prueba dual (antibiosis) para *Pestalotiopsis* sp - *Colletotrichum coffeanum*.

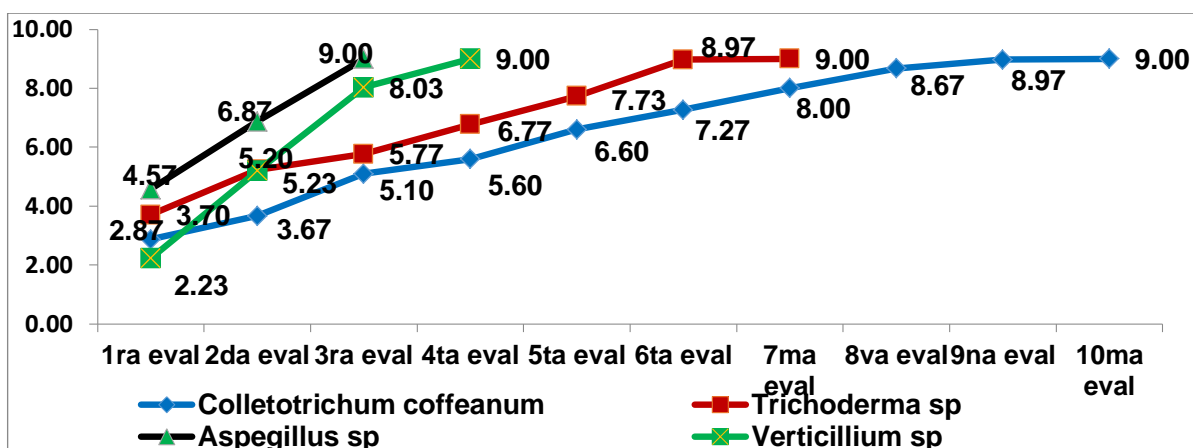


Figura 29: Curvas máximas de crecimiento lineal del hongo *Colletotrichum coffeanum* y endófitos en centímetro.

5.1.2.2. Crecimiento lineal del hongo *Colletotrichum coffeanum* y endófitos en centímetro.

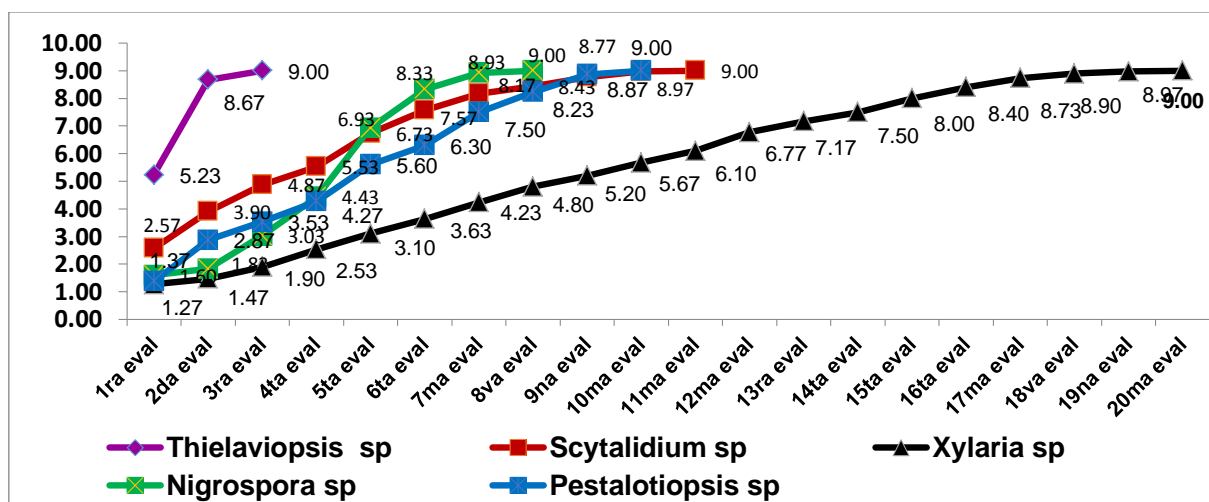


Figura 30: Curvas máximas de crecimiento lineal de hongos endófitos en cm.

5.1.3. Determinación de la capacidad endofítica de los hongos aislados en plántulas de café.

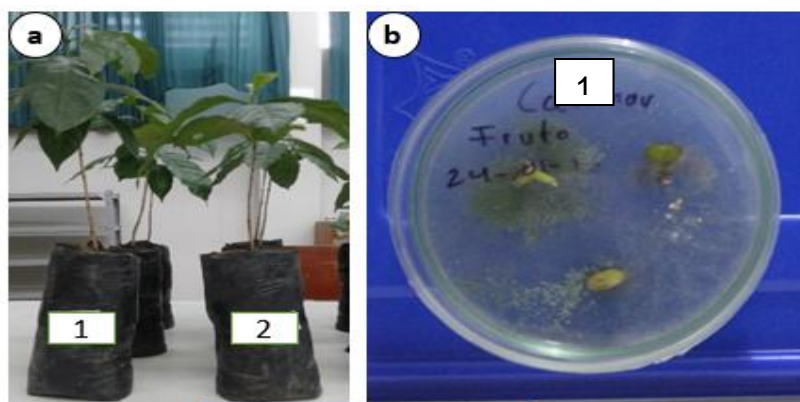


Figura 31: Capacidad endofítica de *Trichoderma* sp, a) Plántulas de café inoculadas con el hongo endófito, 1) Plántula testigo, sin inoculación de hongo, sin presencia de enfermedades. 2) Plántula inoculada con *Trichoderma* sp, planta pequeña respecto al testigo, hojas más pequeñas, menos presencia de hojas, con presencia de clorosis por efecto del hongo endófito que se comporta como patógeno. b) Siembra de tejido vegetal de la plántula de café en placas Petri, podemos observar la colonización del hongo que va desarrollándose.

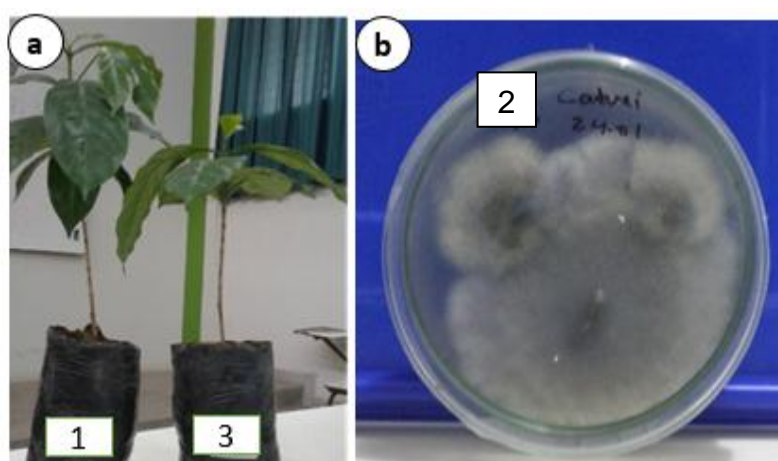


Figura 32: Capacidad endofítica de *Aspergillus* sp, a) Plántulas de café inoculadas con el hongo endófito, 1) Plántula testigo, sin inoculación de hongo, sin presencia de enfermedades. 2) Plántula inoculada con *Aspergillus* sp, planta pequeña respecto al testigo.

al testigo, hojas más pequeñas, menos presencia de hojas, con presencia de clorosis, hojas amarillentas, presencia de estrés, por efecto del hongo endófito que se comporta como patógeno.

b) Siembra de tejido vegetal de la plántula de café en placas Petri, podemos observar la colonización del hongo que va desarrollándose.

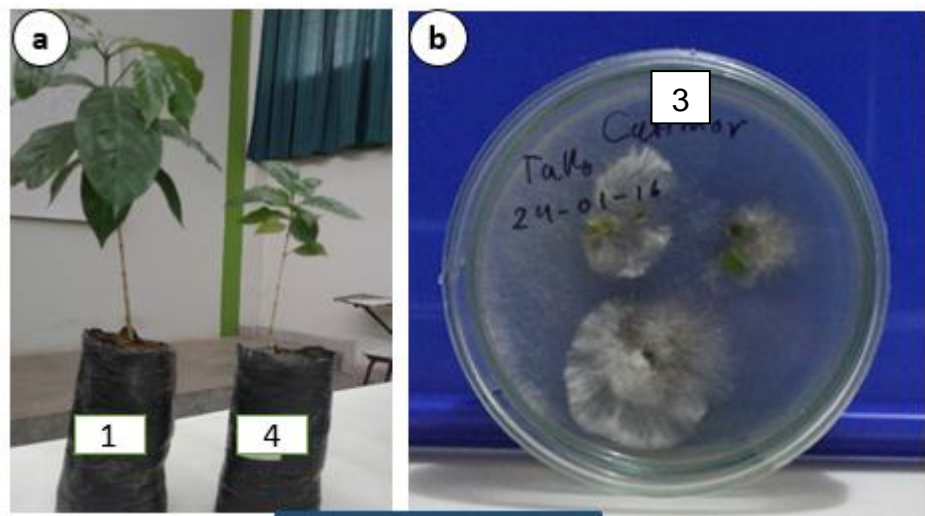


Figura 33: Capacidad endofítica de *Verticilium* sp, a) Plántulas de café inoculadas con el hongo endófito, 1) Plántula testigo, sin inoculación de hongo, sin presencia de enfermedades. 2) Plántula inoculada con *Verticilium* sp, planta pequeña respecto al testigo, hojas más pequeñas, menos presencia de hojas, con presencia de clorosis por efecto del hongo endófito que se comporta como patógeno. b) Siembra de tejido vegetal de la plántula de café en placas Petri, podemos observar la colonización del hongo que va desarrollándose.

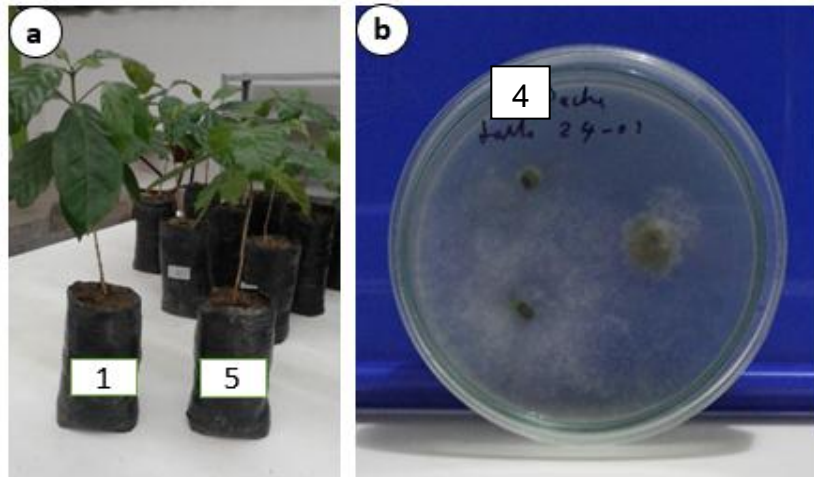


Figura 34: Capacidad endofítica de *Thielaviopsis* sp, a) Plántulas de café inoculadas con el hongo endófito, 1) Plántula testigo, sin inoculación de hongo, sin presencia de enfermedades. 2) Plántula inoculada con *Thielaviopsis* sp, planta pequeña respecto al testigo, hojas más pequeñas, menos presencia de hojas, por efecto del hongo endófito que se comporta como patógeno. b) Siembra de tejido vegetal de la plántula de café en placas Petri, podemos observar la colonización del hongo que va desarrollándose.

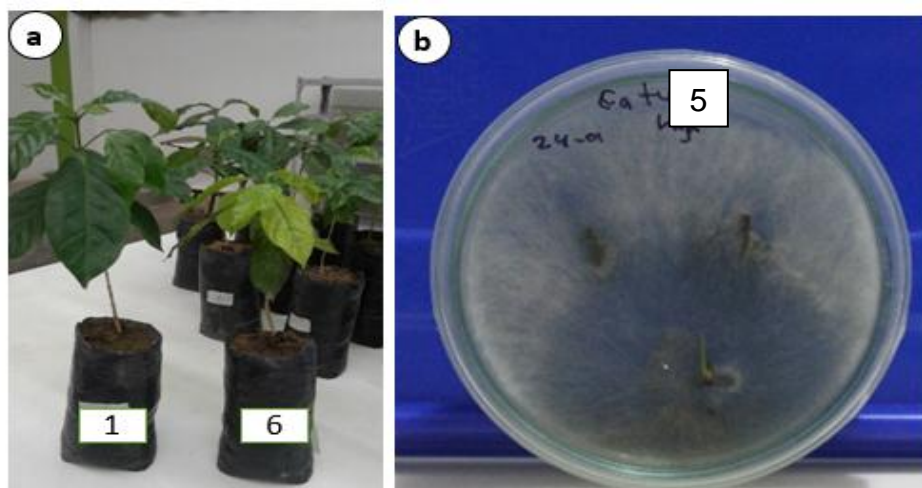


Figura 35: Capacidad endofítica de *Scytalidium* sp, a) Plántulas de café inoculadas con el hongo endófito, 1) Plántula testigo, sin inoculación de hongo, sin presencia de enfermedades. 2) Plántula inoculada con *Scytalidium* sp, planta pequeña respecto

al testigo, hojas más pequeñas, menos presencia de hojas, con presencia de clorosis, amarillamiento en las hojas, tallo no erecto, por efecto del hongo endófito que se comporta como patógeno. b) Siembra de tejido vegetal de la plántula de café en placas Petri, podemos observar la colonización del hongo que va desarrollándose.

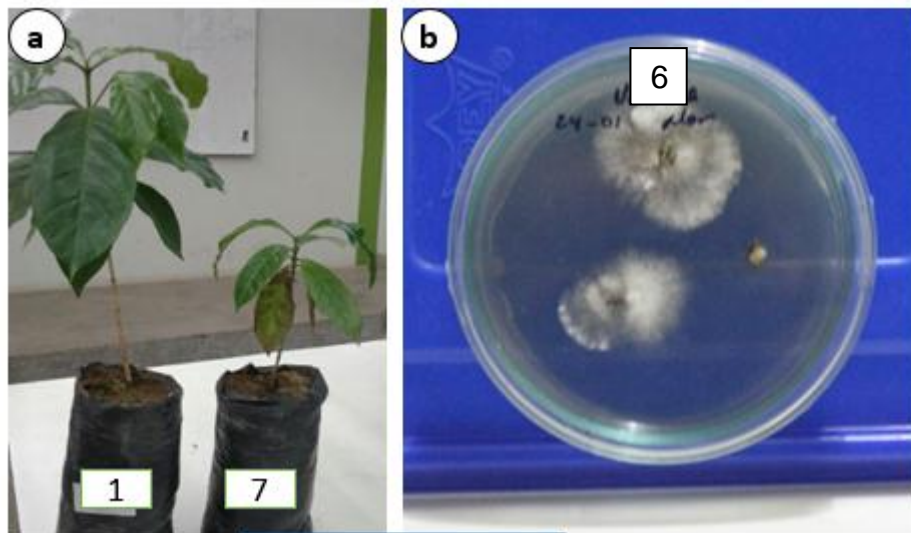


Figura 36: Capacidad endofítica de *Xylaria* sp, a) Plántulas de café inoculadas con el hongo endófito, 1) Plántula testigo, sin inoculación de hongo, sin presencia de enfermedades. 2) Plántula inoculada con *Xylaria* sp, planta pequeña respecto al testigo, hojas más pequeñas, menos presencia de hojas, con presencia de clorosis, amarillamiento en las hojas, necrosis en las hojas, por efecto del hongo endófito que se comporta como patógeno. b) Siembra de tejido vegetal de la plántula de café en placas Petri, podemos observar la colonización del hongo que va desarrollándose.

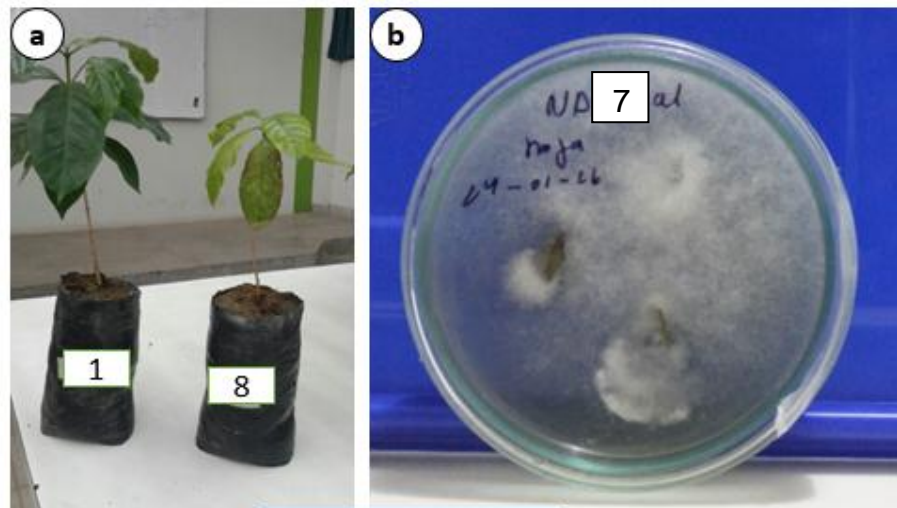


Figura 37: Capacidad endofítica de *Nigrospora* sp, a) Plántulas de café inoculadas con el hongo endófito, 1) Plántula testigo, sin inoculación de hongo, sin presencia de enfermedades. 2) Plántula inoculada con *Nigrospora* sp, planta pequeña respecto al testigo, hojas más pequeñas, menos presencia de hojas, con presencia de clorosis, amarillamiento en las hojas, necrosis en los bordes de las hojas, por efecto del hongo endófito que se comporta como patógeno. b) Siembra de tejido vegetal de la plántula de café en placas Petri, podemos observar la colonización del hongo que va desarrollándose.

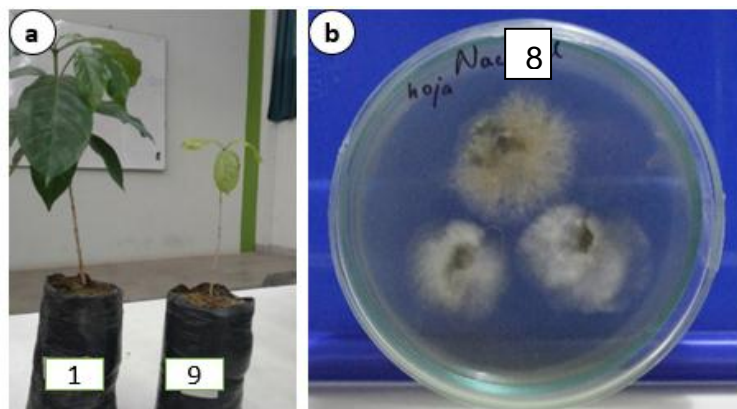


Figura 38: Capacidad endofítica de *Pestalotiopsis* sp, a) Plántulas de café inoculadas con el hongo endófito, 1) Plántula testigo, sin inoculación de hongo, sin presencia de enfermedades.

2) Plántula inoculada con *Pestalotiopsis* sp, planta pequeña respecto al testigo, hojas más pequeñas, menos presencia de hojas, con presencia de clorosis, amarillamiento de las hojas, tallo delgado, por efecto del hongo endófito que se comporta como patógeno. b) Siembra de tejido vegetal de la plántula de café en placas Petri, podemos observar la colonización del hongo que va desarrollándose.

5.1.3.1. Área foliar (cm²).

Cuadro 2: Análisis de varianza para el Área foliar (cm²).

| F.V. | Suma de cuadrados | G.L. | Cuadrático promedio | F.C. | P-valor | Sig. |
|---------------------------|-------------------|------|---------------------|--------|---------|-----------|
| Tratamientos | 14554,521 | 8 | 1819,315 | 36,496 | 0,0001 | ** |
| Error experimental | 1345,935 | 27 | 49,849 | | | |
| Total | 15900,456 | 35 | | | | |

$R^2 = 91,5\%$ C.V. = 17,4% $\bar{x} = 40,57$

**** = (1%).**

Cuadro 3: Prueba de Rangos Múltiples de Duncan (P<0,05) para promedios de área foliar (cm²) por tratamiento.

| Tratamientos | Descripción | Duncan (P<0,05) | |
|--------------|--------------------------|------------------------------|---------------|
| | | Promedios (cm ²) | Significación |
| T7 | <i>Nigrospora</i> sp | 14,84 | a |
| T8 | <i>Pestalotiopsis</i> sp | 20,21 | ab |
| T5 | <i>Xylaria</i> sp | 29,29 | bc |
| T9 | <i>Thielaviopsis</i> sp | 29,62 | bc |
| T6 | <i>Scytalidium</i> sp | 33,38 | c |
| T3 | <i>Verticilium</i> sp | 45,04 | d |
| T4 | <i>Aspergillus</i> sp | 46,30 | d |
| T1 | Testigo | 67,16 | e |
| T2 | <i>Trichoderma</i> sp | 79,34 | f |

*Tratamientos signados con la misma letra son estadísticamente iguales entre sí.

5.1.3.2. Número de hojas.

Cuadro 4: Análisis de varianza para el número de hojas (transformado \sqrt{x}).

| F.V. | Suma de cuadrados | G.L. | Cuadrático promedio | F.C. | P-valor | Sig. |
|---------------------------|-------------------|------|---------------------|-------|---------|-----------|
| Tratamientos | 6,664 | 8 | 0,833 | 9,325 | 0,0001 | ** |
| Error experimental | 1,608 | 18 | 0,089 | | | |
| Total | 8,272 | 26 | | | | |

$R^2 = 80,6\%$ C.V. = 11,0% $\bar{x} = 2,71$

**** = (1%)**

Cuadro 5: Prueba de rangos múltiples de Duncan ($P < 0,05$) para promedios del número de hojas por tratamiento.

| Tratamientos | Descripción | Duncan ($P < 0,05$) | |
|--------------|--------------------------|-----------------------|----------------|
| | | Promedios (N°) | Significación* |
| T7 | <i>Nigrospora</i> sp | 3,5 | a |
| T8 | <i>Pestalotiopsis</i> sp | 4,2 | ab |
| T6 | <i>Scytalidium</i> sp | 5,6 | abc |
| T9 | <i>Thielaviopsis</i> sp | 6,5 | bcd |
| T5 | <i>Xylaria</i> sp | 7,6 | cde |
| T3 | <i>Verticilium</i> sp | 9,0 | def |
| T4 | <i>Aspergillus</i> sp | 9,7 | ef |
| T1 | <i>Testigo</i> | 10,7 | ef |
| T2 | <i>Trichoderma</i> sp | 11,3 | f |

*Tratamientos signados con la misma letra son estadísticamente iguales entre sí.

5.2. Discusión.

5.2.1. Identificación de la diversidad micológica endófito en café procedente del sector San Roque de Cumbaza.

5.2.1.1. *Trichoderma* sp

Presentó colonia de color verde en el anverso, con zonas de micelio blanco, tuvo un anillo de crecimiento que separa una elevación 1: 2, es decir el crecimiento es ondulado, donde se colorea mayor de verde por la abundancia de estructuras propagativas (conidias). Observado a microscopia a 1000 veces de su tamaño original se observó hifas hialinas septadas de donde se forman conidióforos que se ramifican formando cuerpos en forma de botella que según (Barnett y Hunter, 1972) se denominan fiálides; sobre esto se forman conidias de color verde, globosa que mide entre uno y dos micras de diámetro con una relación de largo sobre ancha de 1:1; además presentó escasas clamidosporas y según clave de (Samuels, 2004), descritas para características morfológicas de crecimiento en CMD (Corn meal dextrosa) y PDA (Papa dextrosa agar) para 18 especies comunes del género *Trichoderma*. Así mismo el ICT tiene colecciones de hongos endófitos aislados de ramas de cacao tal como lo mencionan (Viana, 2015), (Trigozo, 2012), corroborando nuestro trabajo que los cultivos de San Martín presentan estos hongos como mecanismo de defensa.

5.2.1.2. *Aspergillus* sp

Presenta colonia de color negro, en varias partes de la placa esto se debe al fácil esparcimiento de las esporas. Al inicio son de color amarillento

luego se torna de color oscuro, lo que demuestra que ya formado sus estructuras propagativas; al observar al microscopio a 100 y 1000 veces su tamaño, se observó conidióforos hialinos con septas bien diferenciadas propio de un *Ascomiceto*, en la parte superior forma una especie de cabeza de donde salen fiálides y en forma radial, sus conidias son marrones oscuros a negro de forma globosa (relación L/a 1:1 de diámetro) que mide entre tres a cuatro micras; según la clave ilustrada para genero de hongos imperfectos de (Barnett y Hunter, 1972), corresponde al género *Aspergillus* sp.

5.2.1.3. *Verticillium* sp

Presentó colonia de color verde oliváceo a crema y blanco a los bordes. Al observar al microscopio la hifa es de color hialino, con septas; presentó conidióforos formando vértice que sale de la septa, luego continúa con la formación de fíales alargados, que sostienen conidias ovaladas, es decir la relación largo por ancho es de 1:5 de color hialino. Estas características morfológicas observadas según la clave (Barnett y Hunter, 1972), corresponde al género *Verticillium*.

5.2.1.4. *Thielaviopsis* sp

Presentó colonias de color blanco, luego se tomó de color marrón oscuro. Sus hifas son de color marrón a verde oliváceo con paredes celulares oscuros, donde forman conidióforos hialinos con fíales anchos en la base y tienen conidias cilíndricas, en cadenas clanioporas presentes, ovoides, de

pared celular, solo en cadenas, según (Barnett y Hunter, 1972), y Ellis, M. (1971), pertenecen al género *Thielaviopsis*.

5.2.1.5. *Scytalidium* sp

Presento colonias de color gris a negro con abundante micelio en forma de pelo o algodonoso; al observar al microscopio compuesto, se observó hifas septadas de color marrón y paredes celulares oscuras, que forman abundante micelio, entre la septa se forman conidias otras esporas intercelulares y terminales cuando son jóvenes son hialinos, luego se toman de color marrón a oscuro, estas características descritas tiene similitud con la clave taxonómica de *Dematiaceous hyphomycetes* de (Ellis, 1971), asimismo tienen concordancia por lo descrito por (Sandoval, 2008), aislados de semillas de *Plukenetia volubilis* en el valle de pinto recodo y San Roque de Cumbaza, pertenece al género *Scytalidium* sp.

5.2.1.6. *Xylaria* sp

La colonia es de color blanco, el estroma cilíndrico claviforme, con un estípite pequeño, que se origina en una base bulbosa, superficie rugosa, ápices estériles, ostiolos finamente papilados que le confieren un aspecto casi equinulado y las esporas de (8.5) 9- 10 (- 12) x 4.5- 5 μ m, con línea germinal recta, igual a la longitud de las esporas, son caracteres diagnósticos de la especie de conformidad con la clave ilustrada para genero de ascomicetos asimismo esta especie ha sido descrito en la Región San Martín por (Rodríguez, 2005) y (Cayotopa, 2014), pertenece al género *Xylaria* sp.

5.2.1.7. *Nigrospora* sp

La colonia es de color blanquecino, café y café oscuro; presentó micelio hialino con septas de donde salen conidióforos cortos simples que terminan en una vesícula hialina sobre la cual forman conidias alourosporas que al inicio es de color hialino luego se tornan de color negro de forma globosa que mide entre 19 a 21 por 14 a 18 micras esta observaciones tienen relación con las descritas por la clave taxonómica ilustrado para el género de hongos imperfectos descritas por (Barnett y Hunter, 1972), pertenece al género *Nigrospora* sp. Esta especie afecta granos de maíz, arroz en la región San Martín, pero en el caso del café se comporta como un hongo endófito tal como se le encontró en tejidos sanos.

5.2.1.8. *Pestalotiopsis* sp

Las colonias son de color blanco, a medida que se desarrollaba el hongo se forma puntos de color negro, carbonoso, observado al microscopio aumentando de 100 a 1000 veces se tamaño original, presento, conidia fusiforme, de cuatro a seis células o loculado, simples o ramificado, sus extremos a veces espatulado, con tres a cuatro proyecciones de hifas, sus conidióforos son producidos dentro de un cuerpo de fructificación compacto denominada cuerpo estromático, estas características morfológicas descritas tienen relación con la clave ilustrada para genero de hongos imperfectos de según (Barnett y Hunter, 1972) y (Sutton, 1980) donde describe a los coelomicetos para hongos imperfectos que presenta picnidio acérvalas y cuerpos estromáticos, pertenece al género *Pestalotiopsis* sp.

5.3. Capacidad de antibiosis e hiperparasitismo de cepas de hongos endófitos de café contra *Colletotrichum coffeanum*.

5.3.1. Crecimiento lineal de la colonia en cm, para *Trichoderma* sp - *Colletotrichum coffeanum*.

La (figura 21), nos presenta las curvas de crecimiento de las colonias de *Trichoderma* sp (línea azul) y *Colletotrichum coffeanum* (línea roja) en centímetro y donde las colonias alcanzaron su máximo rendimiento de 9 cm y 1,82cm en la 9^{na} y 5^{ta} evaluación respectivamente y a partir del cual mantuvieron los mismos valores asintóticos hasta la 30^{ava} evaluación. Así mismo, observamos que al 5^{to} día (5^{ta} evaluación) *Trichoderma* sp con un crecimiento de 7,14cm pudo controlar el crecimiento de *Colletotrichum coffeanum*, quien a partir de ese momento dejó de crecer linealmente.

Las especies del género *Trichoderma* son los antagonistas más utilizados para el control de enfermedades de plantas producidos por hongos, debido a su ubicuidad, a su facilidad para ser aisladas y cultivadas, a su crecimiento rápido en un gran número de sustratos y a que no atacan a plantas superiores (Papavizas *et al.*, 1982). Los mecanismos por los que las cepas del género *Trichoderma* desplazan al fitopatógeno son fundamentalmente de tres tipos. Competición directa por el espacio o por los nutrientes (Elad & Baker 1985), (Elad & Chet, 1987); (Chet & Ibar, 1994), (Belanger *et al.*, 1995), producción de metabolitos antibióticos, ya sean de naturaleza volátil o no volátil (Chet *et al.* 1997), (Sid Ahmed *et al.*, 2003) y parasitismo directo de determinadas especies de *Trichoderma* sobre los hongos fitopatógenos (Yedidia *et al.* 1999), (Ezziyyani *et al.*, 2003).

Como resultados de investigaciones similares, (Ezziyyani *et al.* 2003), en su trabajo de investigación “*Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.)” destacan que de los resultados obtenidos con los dos tipos de inoculación con el patógeno, con zoosporas o con vermiculita infectada, la mejor técnica de infección fue la desarrollada con *P. capsici* crecido en vermiculita. Ello se debe a que la vermiculita con PDB es un medio en el que el patógeno se encuentra en forma micelial y plena actividad virulenta, mientras que las zoosporas de *P. capsici*, aunque se adicionen a la rizófora de la planta en condiciones fisiológicas óptimas de crecimiento en el laboratorio, el inóculo pierde agresividad, tal vez por factores ambientales o debido al estrés sufrido al pasar las zoosporas de un sustrato reducido al suelo. El inóculo de *T. harzianum* utilizado para el tratamiento de las plantas fue el preparado en medio Avy3, que resultó más económico, fácil de preparar y usar, así como por su viabilidad, abundancia y rápido crecimiento (una semana). Pero, sobre todo, por su alto grado de inhibición contra el desarrollo de la podredumbre causada por *P. capsici* tanto en macetas como en el suelo.

5.3.2. Crecimiento lineal de la colonia en cm, para *Aspergillus* - *Colletotrichum Coffeanum*.

La (figura 22), nos presenta las curvas de crecimiento de las colonias de *Aspergillus* sp (línea azul) y *Colletotrichum coffeanum* (línea roja) y donde las colonias alcanzaron su máximo rendimiento de 9cm y 1,66cm en la 6^{ta} y 4^{ta} evaluación respectivamente y a partir del cual mantuvieron los mismos valores asintóticos hasta la 30^{ava} evaluación. También se observó que al 4^{to}

día (4^{ta} evaluación) el crecimiento de *Aspergillus* sp con en 7,28cm pudo controlar el crecimiento de *Colletotrichum coffeanum*.

Las especies del género *Aspergillus* se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza pudiéndose aislar de una gran variedad de substratos. Gracias a la facilidad de dispersión de sus conidios y a su pequeño tamaño, éstos pueden permanecer en suspensión en el ambiente durante un largo periodo de tiempo, por lo que el hombre se encuentra expuesto constantemente a su inhalación. La identificación hasta nivel de especie de estos hongos es cada vez más importante, ya que algunas especies de *Aspergillus* pueden presentar una mayor virulencia y una respuesta distinta a la terapia anti fúngica.

Aspergillus es un género mitospórico que se caracteriza por la producción de hifas especializadas, denominadas conidióforos, sobre los que se encuentran las células conidiógenas que originarán las esporas asexuales o conidios. El conidióforo característico de *Aspergillus*, aunque es una estructura unicelular posee tres partes bien diferenciadas: vesícula (extremo apical hinchado), estipe (sección cilíndrica situada debajo de la vesícula) y célula pie (sección final, a veces separada por un septo, que une el conidióforo con el micelio). Sobre la vesícula se disponen las células conidiógenas, denominadas habitualmente fiálides. En muchas especies, entre la vesícula y las fiálides se encuentran otras células denominadas métulas. Las cabezas conidiales que sólo presentan fiálides se denominan uniseriadas, y las que presentan fiálides y métulas, biseriadas (Abarca, 2000).

5.3.3. Crecimiento lineal de la colonia en cm, para *Verticilium Sp* - *Colletotrichum Coffeanum*.

La (figura 23), nos presenta las curvas de crecimiento de las colonias de *Verticilium sp* (línea azul) y *Colletotrichum coffeanum* (línea roja) y donde las colonias alcanzaron su máximo rendimiento de 9cm y 1,94cm en la 13^{ava} y 8^{va} evaluación respectivamente y a partir del cual mantuvieron los mismos valores asintóticos hasta la 30^{ava} evaluación. También se observó que al 8^{vo} día (8^{va} evaluación) el crecimiento de *Verticilium sp* con en 6,84cm pudo controlar el crecimiento de *Colletotrichum coffeanum*, quien a partir de ese momento dejó de crecer linealmente.

5.3.4. Crecimiento lineal de la colonia en cm, para *Thielaviopsis sp* - *Colletotrichum coffeanum*.

La (figura 24), nos presenta las curvas de crecimiento de las colonias de *Thielaviopsis sp* (línea azul) y *Colletotrichum coffeanum* (línea roja) y donde las colonias alcanzaron su máximo rendimiento de 9cm y 2,2cm en la 20^{ava} y 5^{va} evaluación respectivamente y a partir del cual mantuvieron los mismos valores asintóticos hasta la 30^{ava} evaluación. Sin embargo, también se observó que al 5^{to} día (5^{ta} evaluación) el crecimiento de *Thielaviopsis sp* con en 6,9cm pudo controlar el crecimiento de *Colletotrichum coffeanum*, quien a partir de ese momento dejó de crecer linealmente.

(Pérez *et al.* 2004), identificaron y confirmación de la presencia del hongo *Thielaviopsis paradoxa*, causante de la pudrición negra del fruto de piña oro miel en el departamento de Sucre. Se colectaron frutos de piñas con síntomas

característicos en diferentes zonas productoras del departamento de Sucre. Las muestras se transportaron al laboratorio de investigaciones microbiológicas de la Universidad de Sucre, donde se hizo aislamiento del hongo en medio PDA (Agar Papa Dextrosa) durante 7 días a 25°C, 12h de luz / oscuridad, seguido de la preparación de micro cultivo e identificación morfológica del hongo mediante microscopia óptica, determinando estructuras reproductivas características del hongo y comprobación mediante criterios taxonómicos establecidos. A la fecha es el primer reporte que tiene de este hongo como agente causal de la pudrición negra del fruto de la variedad de piña oro miel producida en el departamento de Sucre.

5.3.5. Crecimiento lineal de la colonia en cm, para *Scytalidium* sp - *Colletotrichum coffeanum*.

La (figura 25), nos presenta las curvas de crecimiento de las colonias de *Scytalidium* sp (línea azul) y *Colletotrichum coffeanum* (línea roja) y donde las colonias alcanzaron su máximo rendimiento de 5,48cm y 4,2cm en la 10^{ma} evaluación respectivamente y a partir del cual mantuvieron los mismos valores asintóticos hasta la 30^{ava} evaluación.

Sandoval (2008) aplicación de fungicidas para el control de *Scytalidium* sp en semillas de *Plukenetia volubilis*, que causo lesiones leves en el cuello de las raíces.

5.3.6. Crecimiento lineal de la colonia en cm, para *Xylaria* sp - *Colletotrichum Coffeanum*.

La (figura 26), nos presenta las curvas de crecimiento de las colonias de *Xylaria* sp (línea azul) y *Colletotrichum coffeanum* (línea roja) donde las colonias alcanzaron su máximo rendimiento de 4,16cm y 4,76cm en la 15^{ava} y 14^{ava} evaluación respectivamente y a partir del cual mantuvieron los mismos valores asintóticos hasta la 30^{ava} evaluación. Siendo que *Xylaria* sp con 4,15cm de crecimiento lineal de la colonia en la 14^{avo} día (14^{ava} evaluación) pudo controlar el crecimiento de *Colletotrichum coffeanum*, quien a partir de ese momento dejó de crecer linealmente.

5.3.7. Crecimiento lineal de la colonia en cm, para *Nigrospora* sp - *Colletotrichum coffeanum*.

La (figura 27), nos presenta las curvas de crecimiento de las colonias de *Nigrospora* sp (línea azul) y *Colletotrichum coffeanum* (línea roja) donde las colonias alcanzaron sus máximos crecimientos con 6,88cm y 2,74cm en la 11^{ava} evaluación y a partir del cual mantuvieron los mismos valores asintóticos hasta la 30^{ava} evaluación respectivamente. Siendo que *Nigrospora* sp cuando alcanzó un crecimiento lineal de 6,88cm de la colonia en la 11^{vo} día (11^{ava} evaluación) pudo controlar el crecimiento de *Colletotrichum coffeanum*, quien a partir de ese momento dejó de crecer linealmente.

5.3.8. Crecimiento lineal de la colonia en cm, para *Pestalotiopsis* sp - *Colletotrichum coffeanum*.

La (figura 28), nos presenta las curvas de crecimiento de las colonias de *Pestalotiopsis* sp (línea azul) y *Colletotrichum coffeanum* (línea roja) donde las colonias alcanzaron sus máximos crecimientos con 5,32cm y 3,76cm en la 15^{ava} y 10^{ava} evaluación respectivamente evaluación y a partir del cual mantuvieron los mismos valores asintóticos hasta la 30^{ava} evaluación. Siendo que *Pestalotiopsis* sp cuando alcanzó un crecimiento lineal de 5,1cm de la colonia en la 10^{mo} día (10^{ava} evaluación) pudo controlar el crecimiento de *Colletotrichum coffeanum*, quien a partir de ese momento dejó de crecer linealmente.

5.3.9. Curvas máximas de crecimiento lineal del hongo *Colletotrichum* sp y endófitos en cm.

Los valores del crecimiento lineal de hongo *Colletotrichum coffeanum* y los hongos endófitos en cm se muestran en el (gráfico 9). El hongo *Aspergillus* sp alcanzó su máximo crecimiento lineal de 9cm en la 3^{era} evaluación, *Verticilium* sp con 9cm en la 4^{ta} evaluación, *Trichoderma* sp con 9cm en 7^{ma} evaluación y *Colletotrichum coffeanum* con 9cm en la 10^{ma} evaluación respectivamente.

5.3.10. Curvas máximas de crecimiento lineal de hongos endófitos en cm.

Los valores del crecimiento lineal de los hongos endófitos en cm se muestran en el (gráfico 10). El hongo *Thielaviopsis* sp alcanzó su máximo crecimiento lineal de 9cm en la 3^{era} evaluación, *Scytalidium* sp con 9cm en la 11^{ava} evaluación, *Pestalotiopsis* sp con 9cm en la 10^{ma} evaluación,

Nigrospora sp con 9cm en la 8^{va} y *Xylaria* sp con 9cm en la 20^{ava} evaluación respectivamente.

5.4. Capacidad endofítica de los hongos aislados en plántulas de café.

5.4.1. Área foliar.

El análisis de varianza (cuadro 2) muestra resultados altamente significativos ($P < 0,01$) para el efecto de tratamientos, el Coeficiente de Determinación (R^2) con 91,5% indica que los tratamientos tuvieron efectos relevantes sobre el área foliar, con una variabilidad de 17,4%. Entre los hongos endófitos y *Colletotrichum* sp.

Con los promedios de tratamientos ordenados de menor a mayor, el (cuadro 3) nos muestra que con el T2 (*Trichoderma* sp) se obtuvo el mayor promedio con 79,34cm² de área foliar, siendo estadísticamente superior a los promedios obtenidos por los tratamientos T1 (testigo), T4 (*Aspergillus* sp), T3 (*Verticillium* sp), T6 (*Scytalidium* sp), T9 (*Thielaviopsis* sp), T5 (*Xylaria* sp.), T8 (*Pestalotiopsis* sp) y T7 (*Nigrospora* sp.) con quienes se obtuvieron promedios de 67,16cm², 46,3cm², 45,04cm², 33,38cm², 29,62cm², 29,29cm², 20,21cm² y 14,84cm² de área foliar respectivamente.

5.4.2. Número de hojas.

El análisis de varianza (cuadro 4) muestra resultados altamente significativos ($P < 0,01$) para el efecto de Tratamientos, el Coeficiente de Determinación (R^2) con 80,6% indica que los tratamientos tuvieron efectos relevantes sobre el

número de hojas, con una variabilidad de 11,0% entre los hongos endófitos y *Colletotrichum* sp.

Con los promedios de tratamientos ordenados de menor a mayor, el (cuadro 5) nos muestra que con el T2 (*Trichoderma* sp) se obtuvo el mayor promedio con 11,3 hojas, siendo estadísticamente igual a los promedios obtenidos con los tratamientos T1 (testigo), T4 (*Aspergillus* sp) y T3 (*Verticillium* sp) con 10,7 hojas, 9,7 hojas y 9,0 hojas respectivamente y superando estadísticamente a los tratamientos T5 (*Xylaria* sp.), T9 (*Thielaviopsis* sp), T6 (*Scytalidium* sp), T8 (*Pestalotiopsis* sp) y T7 (*Nigrospora* sp) con quienes se obtuvieron promedios de 7,6 hojas, 6,5 hojas, 5,6 hojas, 4,2 hojas y 3,5 hojas respectivamente.

VI. CONCLUSIONES

- 6.1.** En el trabajo de investigación se logró identificar a *Trichoderma* sp, *Aspergillus* sp, *Verticillium* sp, *Thielaviopsis* sp, *Scytalidium* sp, *Xylaria* sp, *Nigrospora* sp y *Pestalotiopsis* sp, hongos endófitos encontrados de los tejidos sanos de las plantas de café variedad Catimor.
- 6.2.** El hongo endófito *Aspergillus* sp tuvo el más rápido crecimiento y desarrollo lineal de la colonia, siendo que a los 6 días (6ta evaluación) alcanzó su máximo desarrollo con 9cm y a los cuatro días con un crecimiento de 7,28cm pudo controlar el crecimiento y desarrollo lineal de la colonia de *Colletotrichum* sp quien alcanzó 1,66cm. Seguido de *Trichoderma* sp quien alcanzó su máximos crecimiento de 9cm al 9^{no} día (9^{na} evaluación) y que con un crecimiento de 7,14cm al 5^{to} día (5^{ta} evaluación) pudo controlar el crecimiento y desarrollo lineal de la colonia de *Colletotrichum* sp quien alcanzó 1,82cm.
- 6.3.** En las plántulas de café inoculadas con *Trichoderma* sp se obtuvo el mayor promedio de número de hojas y área foliar con 11,3 hojas y 79,34cm² respectivamente. En la capacidad endófito, las plantas inoculadas con *Trichoderma* sp, *Aspergillus* sp y *Verticillium* sp tuvieron mejor efecto de control sobre *Colletotrichum* sp esto se vio reflejado en el mayor número, el tamaño, vigor de las hojas además no presentaron síntomas de enfermedad.

VII. RECOMENDACIONES

- 7.1.** Realizar estudios de caracterización más detallada de cada uno de los hongos endófitos estudiados.
- 7.2.** Identificar más hongos endófitos con potenciales de biocontroladores para el control de *Colletotrichum coffeanum*, en el cultivo de café.
- 7.3.** Estudiar el comportamiento y efecto de los hongos endófitos en parcelas de Café, con problemas de *Colletotrichum coffeanum*.

VIII. BIBLIOGRAFIA

1. Abarca L. (2000). *Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial*. Rev Iberoam Micol; 17: S79-S84. Departament de Sanitat i d'Anatomia Animals (Microbiologia) Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona. 6 p.
2. Agrios, G. (2005). *Plant pathology* forty edition.
3. Araujo W.L.; Mendes, R.; Pizzirani-Kleiner, A. And J.M., Raaijmakers (2007). *Diversity of Cultivated Endophytic Bacteria from Sugarcane: Genetic and Biochemical Characterization of Burkholderia cepacia Complex Isolates*. Applied and Environmental Microbiology: 7259–7267
4. Arnold A, Maynard Z, Gilbert Gs, Coley Pd, Kursar Ta. (2000). *¿Are Tropical Fungal Endophytes Hyperdiverse?* Ecol Lett. 1995; 3:267-274.
5. Arnold A, Mejía Lc, Kyllo D, Rojas Ei, Maynard Z, Robbins N, Herre EA. *Fungal Endophytes Limit Pathogen Damage in a Tropical Tree*. Proc Natl Acad Sci U S A. (2003); 100:15649-15654.
6. Bacon C y Hill, (2005). *Epichloe typhina* From Toxic Tall Fescue Grasses. Appl Environ Microbiol.
7. Backman P Y Sikora R, (2008) *Endophytes: an emerging tool for biological control*. Biol Control, 1-3.
8. Bacon Cw, Porter Jk, Robbins Jd, Luttrell Es (2000), *Epichloe typhina* From Toxic Tall Fescue Grasses. Appl Environ Microbiol.
9. Barnett, H. & Hunter, B. (1972). *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. Third Edition. Burgess Publishing Company. Minneapolis, Minnesota. 241p.
10. Belanger R, Dufour N, Caron J & Benhamou N. (1995). *Chronological events associated with the antagonistic properties of Trichoderma harzianum against*

Botrytis cinerea: Indirect evidence for sequential role of antibiotics and parasitism. *Biocontrol Science Technology* 41-54.

11. Bonilla, J. (1980). *Estudio del ojo de Gallo causado por el hongo Mycena citricolor*. En: *Simposio Latinoamericano sobre Caficultura*, Tegucigalpa, Honduras) Trabajos, Tegucigalpa, IICA, PROMECAFE. (IICA) Serie ponencias, resultados y recomendaciones de eventos técnicos): 177- 188.
12. Cayotopa, J. (2014). *Identificación de mico endófitos de seis especies de sachá inchi*. San Martín – Perú.
13. Chet I & Ibar J. (1994). *Biological control of fungal pathogens*. *Applied Biochemistry & Biotechnology* 37-43.
14. Chet I, Ibar J & Hadar I. (1997). *Fungal antagonists and mycoparasites*. In *The Mycota IV: Environmental and Microbial Relationships* (Wicklow DT & Soderstrom B, eds). New York: Springer Verlag, pp. 165-192.
15. Claus, H.; Bausinger, T.; Lehmler, I.; Perret, N.; Fels, G.; Dehner, U.; Preuß, J.; & H. König. (2007). *Transformation of 2, 4, 6 trinitrotoluene (TNT) by Raoultella terrigena*. *Biodegradation*. 27-35.
16. Elad Y & Baker R. (1985). *The role of competition for iron and carbon suppression of chlamidospore germination of Fusarium spp. by Pseudomonas spp.* *Phytopathology* 1053.
17. Elad Y & Chet I. (1987). *Possible role of competition for nutrients in biocontrol of Pythium damping-off by bacteria*. *Phytopathology* 77: 190-195.
18. Ellis, M. (1971). *More Dematiaceous Hyphomycetes*. C.A.B. International Mycological Institute Kew, Surrey, England. 507 pp.
19. Ellis, M. (1976). *More Dematiaceous Hyphomycetes*. C.A.B. International Mycological Institute, Kew Surrey, England. 507 pp.

20. Ezziyyani M; Pérez S; Ahmed Sid, A; María Emilia Requena M.; y Candela M. (2004), "*Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.)" Dpto de Biología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, Espinardo, Anales de Biología 26: 35-45. 12 p.
21. Ezziyyani M, Requena ME, Pérez Sánchez C, Egea Gilabert C & Candela ME. (2003). *Mecanismos de biocontrol de la «tristeza» del pimiento (*Capsicum annuum* L.) por microorganismos antagonistas*. Actas de la XV Reunión de la Sociedad Española & VIII Congreso Hispano Luso de Fisiología Vegetal.
22. Hanlin, R. (1990). *Illustrated genera of Ascomycetes*. APS PRESS. The American phytopathological society. Second printing. Printed in Minnesota in United States of America. Pág. 263.
23. Johnson J, Harrod R, (2001). Molecular biology and pathogenesis of the human T-cell leukaemia/lymphotropic virus Type-1 (HTLV-1).
24. Mariño, Y. (2007). *Identificación de bacterias en cicadélidos vectores potenciales de *Xylella fastidiosa* Wells et al. que se alimentan del tejido vascular de plantas de café *Coffea arabica* L. en tres localidades de Puerto Rico*. Tesis M. Sc en Protección de Cultivos. Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez. 160 p.
25. Papavizas G, Lewis J & Abd-Elmoity TH. (1982). *Evaluation of new biotypes of *Trichoderma harzianum* for tolerance to Benomyl and enhanced biocontrol capabilities*. Phytopathology 72: 126-132.
26. Pérez C; Chamorro A.L.; Romero G.J. (2004). *Presencia del hongo *Thielaviopsis paradoxa* causante de pudrición negra de la piña oro miel en el*

Departamento de Sucre. Laboratorio Investigaciones Microbiológica, grupo de investigación en Bioprospección Agropecuaria. Universidad de Sucre, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Rev Colombiana Cienc Anim.

27. Rodríguez, A. (2005). *Biodiversidad de hongos endófitos de especies vegetales y su potencial bioplaguicida*, Investigadora del Departamento de Biotecnología y Química de Productos Naturales del Instituto de Productos Naturales y Agrobiología (IPNA-CSIC), Facultad de Ciencias.
28. Salas, (2010). Aislamiento e identificación de endófitos y epífitos en hojas de café colectadas en dos zonas de costa rica y su posible empleo como biocontroladores de *mycena citricolor*.
29. Samuels, G. (2004), *Trichoderma a guide to identification and biology*.
30. Sandoval, R. (2008). "Identificación y control *In vitro* de enfermedades fungosas en semillas de sachá inchi en San Martín.
31. Sid Ahmed A, Ezziyyani M, Pérez Sánchez C & Candela ME. (2003). *Effect of chitin on biological control activity of Bacillus spp. and Trichoderma harzianum against root rot disease in pepper (Capsicum annuum) plants*. European Journal of Plant Pathology. 418-426
32. Silva, M.; Várzea, V.; Guerra-Guimarães, L.; Gil Azinheira, H.; Fernández, D.; Petitot, A.S.; Bertrand, B.; Lashermes, P.; Y Nicole, M. (2006). *Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee berry disease*. Braz. J. Plant Physiol. 119-147.
33. Silva C; Batista L; Abreu L; Dias E; Schwan R. (2008). *Succession of bacterial and fungal communities during natural coffee (Coffea arabica) fermentation*, Food Microbiol. 951 - 957.

34. Strobel, G.A. y Long, D.M. (1996). *Endophytic microbes embody pharmaceutical potencial*. ASM News. 263-268.
35. Sutton, B. (1980). *The coelamyoetes: fungi imperfecti with pyonidia, acervuli and stromata commonwealth mycological institute, kew, surrey, England*.
36. Temis, A, López, A., & Sosa, M. E. (2011). *Producción de café (Coffea arábica L.): cultivo, beneficio, plagas y enfermedades*. Temas selectos de ingeniería de alimentos, Pág.54-74. Puebla, México.
37. Teng, Y.; Tzeng, K. y Hsu, S. (2006). *Screening rhizobacteria for promoting tomato growth and testing their potential for control of bacterial wilt disease caused by Ralstonia solanacearum*. Pathology. Bull. 83-95.
38. Trigozo, E, (2012), "Influencia de *trichoderma* spp endófito sobre el crecimiento e inducción de resistencia al estrés hídrico en cacao (*theobroma cacao* L.)"- ICT- San Martin.
39. Vega, F; Pava-Ripoll, M; Posada, F.; Buyer, J. (2005). *Endophytic bacteria in Coffea arabica L. J. Basic Microbiol.* 371–380.
40. Viena, F. (2015) *control biologico de verticillium dahlia patogeno del cacao (teobroma cacao), con aislamientos de trichoderma spp endófito*.
41. Yedidia I, Benhamou N & Chet I. (1999). *Induction of defence responses in cucumber plants (Cucumis sativus L.) by the biocontrol agent Trichoderma harzianum*. Applied and Environmental Microbiology. 1061-1070.

Linkografia

Http: [//www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/about-codex/es/](http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/about-codex/es/), fecha 20/11/16; hora 14 pm.

www.fao.org/contact-us/licence-request o a.copyright@fao.org. Fecha 25/11/16; hora 20 pm.

<http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/copyright/es/#c67991> fecha 10/12/16; hora 8 am.

ANEXOS

Anexo 1. Área foliar de plantas inoculadas con hongos endófitos.

| PLANTAS INOCULADAS CON HONGOS ENDOFITOS | | | | | | | | | |
|---|---------------------------|------------------|--------|----------|--------|------------------|--------|----------|--------|
| AREA FOLIAR (cm) | | | | | | | | | |
| Ítem | Tratamiento | Ancho de la hoja | | | | Largo de la hoja | | | |
| | | planta 1 | | planta 2 | | planta 1 | | planta 2 | |
| | | Hoja 1 | Hoja 2 | Hoja 1 | Hoja 2 | Hoja 1 | Hoja 2 | Hoja 1 | Hoja 2 |
| 1 | <i>Testigo</i> | 6,1 | 6,4 | 6 | 5,7 | 16 | 15,4 | 13,8 | 13,9 |
| 2 | <i>trichoderma sp.</i> | 7,5 | 7,3 | 6,9 | 7,1 | 15,2 | 15,4 | 14 | 14,1 |
| 3 | <i>Aspergillus sp.</i> | 5,1 | 4,9 | 5 | 4,9 | 13 | 12,4 | 12,7 | 11,5 |
| 4 | <i>Verticilium sp.</i> | 5,6 | 5,8 | 4,6 | 4,5 | 12,3 | 12,6 | 10,5 | 11,1 |
| 5 | <i>Thielaviopsis sp.</i> | 4,4 | 5 | 3,5 | 3,4 | 10,7 | 10,8 | 8,1 | 8,4 |
| 6 | <i>Stalidium sp.</i> | 3,9 | 3,4 | 4,8 | 4,8 | 9,7 | 8,9 | 11,5 | 11,4 |
| 7 | <i>Xilaria sp.</i> | 4,1 | 4,3 | 3,8 | 3,8 | 9,6 | 10,2 | 9,7 | 9,5 |
| 8 | <i>Nigrospora sp.</i> | 2,5 | 2,7 | 3,7 | 3 | 6,1 | 6,4 | 7,4 | 6,4 |
| 9 | <i>Pestalotiopsis sp.</i> | 3,5 | 3,6 | 3,1 | 2,7 | 9,4 | 9,9 | 6,9 | 6,6 |

Anexo 2. Número de hojas por planta inoculadas por hongos endófitos

| Numero de hojas por planta inoculadas por hongos endófitos | | | | |
|--|-------------------------------|-----------------|----------|----------|
| Ítem | Tratamientos (hongo endófito) | Numero de hojas | | |
| | | Planta 1 | Planta 2 | Planta 3 |
| 1 | <i>testigo</i> | 11 | 10 | 11 |
| 2 | <i>trichoderma sp.</i> | 13 | 11 | 10 |
| 3 | <i>Aspergillus sp.</i> | 10 | 10 | 9 |
| 4 | <i>Verticilium sp.</i> | 9 | 8 | 10 |
| 5 | <i>Thielaviopsis sp.</i> | 9 | 4 | 7 |
| 6 | <i>Stalidium sp.</i> | 5 | 7 | 5 |
| 7 | <i>Xilaria sp.</i> | 8 | 9 | 6 |
| 8 | <i>Nigrospora sp.</i> | 4 | 2 | 5 |
| 9 | <i>Pestalotiopsis sp.</i> | 6 | 4 | 3 |